

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 627**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 39/40** (2006.01)  
**A61K 39/44** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 5/16** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2003 E 03779105 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1578446**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD33 y método para el tratamiento de leucemia mieloide aguda usando los mismos**

30 Prioridad:

**07.11.2002 US 424332 P**

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

**02.07.2015**

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)  
830 Winter Street  
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**HOFFEE, MARY G.;  
TAVARES, DANIEL y  
LUTZ, ROBERT J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 539 627 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 método para el tratamiento de leucemia mieloide aguda usando los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a CD33. Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos anti-CD33, fragmentos y homólogos de dichos anticuerpos, versiones humanizadas y modificadas en superficie de dichos anticuerpos, equivalentes funcionales y versiones mejoradas de dichos anticuerpos, inmunocombinados y composiciones que comprenden dichos anticuerpos, y los usos de los mismos en aplicaciones de diagnóstico, investigación y terapéuticas.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica los anticuerpos, vectores que comprenden los polinucleótidos, células huésped transformadas con polinucleótidos y métodos para producir los anticuerpos.

**Antecedentes de la invención**

15 El antígeno de diferenciación de leucocitos CD33 es una glicoproteína transmembrana de 364 aminoácidos con homología de secuencia con miembros de la familia sialoadhesina, incluyendo la glicoproteína asociada a mielina y CD22, así como la sialoadhesina en sí misma (S. Peiper, 2002, *Leucocyte Typing VII, White Cell Differentiation, Antigens, Proceedings of the Seventh International Workshop and Conference, Oxford University Press, p. 777*).

20 La expresión de CD33 parece ser altamente específica para el compartimento hematopoyético, con una fuerte expresión por las células precursoras mieloides (S. Peiper, 2002). Se expresa por las células progenitoras mieloides tales como CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G y BFU-E, monocitos/macrófagos, precursores de granulocitos tales como promielocitos y mielocitos aunque con expresión disminuida después de maduración y diferenciación, y granulocitos maduros aunque con un nivel bajo de expresión (S. Peiper, 2002).

Por el contrario, las células madre hematopoyéticas pluripotentes que dan lugar a "colonias de blastos" *in vitro* (Leary, A. G. et al., 1987, *Blood* 69:953) y que inducen cultivos de médula hematopoyética a largo plazo (Andrews R. G. et al., 1989, *J. Exp. Med.* 169:1721; Sutherland, H. J. et al., 1989, *Blood* 74:1563) parecen carecer de expresión de CD33.

25 Aunque la función específica de CD33 no se conoce, su homología con sialoadhesina sugirió un papel en la característica de unión a carbohidrato de la familia lecitina, un papel confirmado posteriormente (S. Peiper, 2002).

De forma importante, los anticuerpos monoclonales anti-CD33 han mostrado que CD33 es expresado por células clonogénicas de leucemia mielógena aguda (AML) en más del 80 % de los casos humanos (LaRussa, V. F. et al., 1992, *Exp. Hematol.* 20:442-448).

30 Debido a la expresión selectiva de CD33, los inmunocombinados que combinan fármacos citotóxicos con anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen específicamente a CD33 se han propuesto para uso en el direccionamiento selectivo a células AML. Se espera que dichas terapias no afecten a las células madre y progenitores hematopoyéticos primitivos. Los inmunocombinados que utilizan anticuerpos anti-CD33 incluyen inmunocombinados anti-CD33-ricina que se ha mostrado que son altamente letales para células AML (Roy, D. C. et al., 1991, *Blood* 77:2404; Lambert, J. M. et al., 1991, *Biochemistry* 30:3234), y aún así respeta a las células madre que apoyan la hematopoyesis normal y la reconstitución hematopoyética (LaRussa, V. F. et al., 1992, *Exp. Hematol.* 20:442-448).

35 Los estudios adicionales usando inmunocombinados han mostrado un direccionamiento rápido de anticuerpos anti-CD33 radiomarcados a células blastos leucémicas en sangre periférica y médula cuando se administran *i.v.* (Scheinberg, D. A. et al., 1991, *J. Clin. Oncol.* 9: 478-490; Schwartz, M. A. et al., 1993, *J. Clin. Oncol.* 11:294-303). La rápida internalización del anticuerpo por la célula diana también se ha observado en estudios *in vitro* (Tanimot, M. et al., 1989, *Leukemia* 3: 339-348; Divgi, C. R. et al., 1989, *Cancer Res. Supl. Vol.* 30: 404a). La evaluación de un anticuerpo anti-CD33 humanizado combinado con el potente anticuerpo antitumoral caliqueamicina (Gemtuzumab ozogamicina) en estudios pre-clínicos demostró la muerte específica de células de leucemia en cultivos de células HL-60, xenoinjertos tumorales HL-60 en ratones, y muestras de médula de pacientes con AML (Hamann, P. R. et al., 40 2002, *Bioconjugate Chem.* 13: 47-58).

45 Lutz et al.: "Eradication of acute myeloid leukemia tumor xenograft by an anti CD33-DM1 immunocombinado", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NUEVA YORK, NY, vol. 43, 1 marzo 2002 (2002-03-01), página 912, describe que el anticuerpo murino My9-6 combinado con el fármaco maitansinoide DM1 (My9-6-DM1) muestra una potente toxicidad específica de antígeno frente a xenoinjertos tumorales de leucemia mieloide.

50 Tomando como base los resultados positivos de estos estudios pre-clínicos, se evaluó Gemtuzumab ozogamicina en estudios clínicos de fase I y II. En los estudios de Fase I, la toxicidad principal observada fue mielosupresión debida a la expresión de CD33 en células progenitoras mieloides (Sievers, E. L. et al. 1999, *Blood* 93: 3678-3684; Sievers E. L. et al., 2001, *J. Clin. Oncol.* 19: 3244-3254.). Los estudios de Fase II con una dosis de 9 mg/m<sup>2</sup> *i.v.* durante 4 horas, repetida después de 14 días, rindió una proporción de respuesta de 30 %. La aprobación para la

comercialización de Gemtuzumab ozogamicina se concedió por la FDA en mayo 2000 con indicación para el tratamiento de pacientes con AML positiva para CD33 en primera recaída que tenían 60 años de edad o más y que no se consideran candidatos para quimioterapia citotóxica. Los informes después de la comercialización han indicado el potencial para toxicidad significativa, especialmente enfermedad venooclusiva (VOD), que ha dado lugar a revisiones de etiquetado e inicio de un programa de vigilancia de los pacientes. Mucha de esta toxicidad puede estar relacionada con el componente de fármaco caliqueamicina, que se ha mostrado que causa hepatotoxicidad en modelos pre-clínicos, y por lo tanto puede no ser un resultado directo del direccionamiento de CD33.

Aunque los resultados discutidos anteriormente sugieren que los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-CD33 y un fármaco citotóxico pueden usarse con éxito en el tratamiento de AML, existe una necesidad de inmunoconjugados que sean tanto seguros como efectivos. La presente invención está dirigida a éstos y otros objetivos importantes.

**Resumen de la invención**

De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos que se unan específicamente a CD33, y que puedan usarse en el tratamiento de AML, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Así, en una primera realización, se proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a epítipo de éste, que tiene la capacidad de unirse a CD33, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una segunda realización, la descripción se refiere al anticuerpo murino My9-6, que se caracteriza completamente en la presente memoria respecto a las secuencias de aminoácidos de las regiones variables tanto de su cadena ligera como pesada, las secuencias de ADNc de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de sus CDR (regiones determinantes de la complementariedad), la identificación de sus aminoácidos de superficie, y medios para su expresión en forma recombinante.

En una tercera realización, se proporcionan versiones humanizadas o modificadas en superficie del anticuerpo My9-6 en el que los residuos expuestos en la superficie del anticuerpo My9-6 o fragmentos de unión a epítipo de éste se reemplazan tanto en las cadenas ligeras como pesadas para asemejarse más a superficies de anticuerpo humano conocidas, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Dichos anticuerpos humanizados pueden tener una utilidad incrementada, comparados con My9-6 murino, como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Las versiones humanizadas del anticuerpo My9-6 también se caracterizan completamente en la presente memoria respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de las regiones variables tanto de cadena ligera como pesada, las secuencias de ADN de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de las CDR, la identificación de sus aminoácidos de superficie, y descripción de un medio para su expresión en forma recombinante.

En una cuarta realización, se proporcionan anticuerpos, como se define en las reivindicaciones adjuntas, o fragmentos de unión a epítipo de éstos, que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-6:

- SYIIH (SEQ ID NO:1),
- VIYPGNDDISYNQKFXG (SEQ ID NO:2), en la que X es K o Q,
- EVRLRYFDV (SEQ ID NO:3),
- KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO:4),
- WASTRES (SEQ ID NO:5),
- HQYLSSRT (SEQ ID NO:6),

y que tienen la capacidad de unirse a CD33.

En una realización adicional, se proporcionan anticuerpos, como se define en las reivindicaciones adjuntas, o fragmentos de unión a epítipo de éstos, que comprenden al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región variable de cadena ligera, en el que dicha región variable de cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOs: 1-3, respectivamente,

SYIYH (SEQ ID NO:1),  
 VIYPGNDDISYNQKFXG (SEQ ID NO:2), en la que X es K o Q,  
 EVRLRYFDV (SEQ ID NO:3),

y en el que dicha región variable de cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOs: 4-6, respectivamente,

KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO:4),  
 WASTRES (SEQ ID NO:5),  
 HQYSSRT (SEQ ID NO:6).

- 5 En una realización adicional, la presente invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un fármaco o profármaco unido covalentemente, directamente o a través de un conector escindible o no escindible, a un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo de éste de la presente invención. En realizaciones preferidas, el fármaco o profármaco es un fármaco o profármaco citotóxico tal como un maitansinoide, un taxoide, CC-1065, un análogo de CC-1065, dolastatina y un análogo de dolastatina.
- 10 En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo de éste de la presente invención y un fármaco o profármaco.
- En una realización adicional, la presente invención comprende composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, fragmento de unión a epítipo de éste o inmunoconjugado de la presente invención, bien solo o en combinación con un fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptables.
- 15 En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo de éste que está marcado para uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En realizaciones preferidas, el marcador es un marcador de biotina, un marcador de enzima, un radio-marcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imagen o un ión metálico.
- 20 En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD33 mediante el uso de un anticuerpo, fragmento de unión a epítipo de éste o inmunoconjugado de la presente invención, bien solo o en combinación con un fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, además solo o en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptables.
- En una realización adicional, la presente invención proporciona usos para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad en la que se expresa CD33 que comprende administrar un anticuerpo, un fragmento de unión a epítipo de éste o inmunoconjugado de la presente invención, bien solo o en combinación con otro fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, además solo o en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptables. La enfermedad puede ser una o más de, por ejemplo, síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia pro-mielocítica (PML), u otra enfermedad todavía por determinar
- 25 En la que se expresa CD33.
- Los usos incluyen la aplicación *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoconjugados de la presente invención, bien solos o en combinación con un fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, además solo o en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptables.
- 35 También se describe un método para determinar si una muestra biológica contiene una célula cancerosa mielógena se proporciona en el que una muestra biológica se pone en contacto con un reactivo de diagnóstico, tal como un anticuerpo marcado o fragmento de unión a epítipo de éste de la presente invención, y se detecta la distribución del reactivo en la muestra. Este método puede usarse para diagnosticar un cáncer tal como leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia pro-mielocítica (PML).
- En una realización adicional, se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a epítipo de éstos de la presente invención que tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a epítipo de éstos que tienen afinidad mejorada para CD33 pueden prepararse por técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridomas y selección para anticuerpos con características específicas.
- 40 Los anticuerpos mejorados también pueden prepararse por maduración de la afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo de éste de la presente invención, a través, por ejemplo, de mutagénesis dirigida a sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de casete. PCR tendente a error, intercambio de cadenas de ADN y uso de cepas mutadoras de *E. coli*.
- 45

En una realización adicional, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a epítipo de éstos de la presente invención, vectores recombinantes que comprenden los polinucleótidos, células huésped transformadas con los vectores recombinantes y métodos para producir dichos anticuerpos y fragmentos de unión a epítipo de éstos mediante el cultivo de dichas células huésped.

- 5 En una realización final, la presente invención proporciona un método para obtener CD33 de un material biológico usando un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo de éste de la presente invención.

**Descripción breve de los dibujos**

10 La Figura 1 muestra los resultados de un experimento de unión de competición en el que se ensayó la unión de anticuerpo My9-6 marcado con <sup>125</sup>I (3 x 10<sup>-9</sup> M) a células U-937 positivas para CD33 en presencia de concentraciones crecientes bien de anticuerpo My9 o My9-6.

La Figura 2 muestra los cebadores degenerados de My9-6 para la secuencia señal de la cadena ligera.

La Figura 3 muestra los nombres de archivos de las 127 estructuras de anticuerpo de la base de datos Brookhaven que se usaron para predecir la superficie de la región variable de muMy9-6.

15 La Figura 4 muestra los cebadores de PCR usados para construir las 16 versiones modificadas en superficie de My9-6 así como anticuerpo My9-6 quimérico.

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

20 La Figura 6A muestra los resultados de secuenciación Edman comparados con la secuencia de aminoácidos derivada de los clones de ADNc generados por RT-PCR para la cadena ligera de muMy9-6.

La Figura 6B muestra los resultados del análisis de secuencia MS-MS de los fragmentos peptídicos de 1.139 Da y 1.122 Da que contienen secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente. Las secuencias de CDR están en **negrita**.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis de secuencia MS-MS del péptido de 1.788 Da y la secuencia correspondiente derivada de dos clones de ADNc.

25 La Figura 8A muestra la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de cadena ligera para el anticuerpo murino My9-6. Las tres CDR están subrayadas.

La Figura 8B muestra la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo murino My9-6. Las tres CDR están subrayadas.

La Figura 9 muestra las CDR de cadena ligera y pesada según se determina por las definiciones de Kabat.

30 La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y cadena pesada para el anticuerpo murino My9-6 alineadas con las secuencias de la línea germinal para los genes 8-27 y V102. Los puntos (.) indican identidad de secuencia.

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

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

40 La Figura 13A muestra las accesibilidades de los residuos al disolvente para las diez estructuras de cadena ligera más homólogas, calculadas con el software MC, y muestra las medias para cada posición Kabat, tabuladas con Excel. Esta tabla presenta los datos para posiciones no CDR con accesibilidades medias al disolvente mayores de 25 %. Un residuo de superficie se define como un residuo con más de un 30 % de accesibilidad media al disolvente. Las posiciones con 25 %-35 % de accesibilidades medias se analizaron adicionalmente calculando las accesibilidades medias de estructuras sólo con residuos idénticos en esa posición así como en las dos posiciones 45 flanqueantes a cada lado. NA se refiere a posiciones flanqueantes idénticas no disponibles. Las posiciones 15 y 70 requirieron cálculos adicionales para llegar a las predicciones de superficie finales proporcionadas en la última columna.

50 La Figura 13B muestra las accesibilidades de los residuos al disolvente para las diez estructuras de cadena pesada más homólogas, calculadas con el software MC, y muestra las medias para cada posición Kabat, tabuladas con Excel. Esta tabla presenta los datos para posiciones no CDR con accesibilidades medias al disolvente mayores de 25 %. Un residuo de superficie se define como un residuo con más de un 30 % de accesibilidad media al disolvente. Las posiciones con 25 %-35 % de accesibilidades medias se analizaron adicionalmente calculando las

accesibilidades medias de estructuras sólo con residuos idénticos en esa posición así como en las dos posiciones flanqueantes a cada lado. NA se refiere a posiciones flanqueantes idénticas no disponibles.

La Figura 14 muestra los residuos de superficie marco de My9-6 que se encuentran en 5 Å de un residuo CDR.

5 La Figura 15 muestra las cinco secuencias humanas mejores extraídas de la base de datos Kabat. Se generaron alineamientos por SR (Pedersen, 1993). Los residuos de muMy9-6 que se encuentran en 5 Å de una CDR están subrayados.

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

La Figura 17 muestra los valores  $K_D$  de My9-6 calculados por ensayo de unión directa en membranas de HL-60 y células completas HL-60, así como ensayo de unión competitiva en membranas de HL-60. N= 3 excepto para \* en el que N= 2.

15 La Figura 18 muestra curvas de unión para huMy9-6 V1.0. (A): unión directa en membranas de HL-60. (B): unión directa en células completas HL-60. (C): unión competitiva en membranas de HL-60.

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

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

20 La Figura 21 muestra los resultados de experimentos de eficacia de My9-6-DM1 en ratones SCID que portan xenoinjertos HL-60. Se evaluó el efecto de My9-6-DM1 (A) y anticuerpo My9-6 no modificado (C) sobre el crecimiento de tumores HL-60. El peso corporal de los ratones se monitorizó como una indicación de toxicidad (B, D).

25 La Figura 22 muestra una comparación de la eficacia de My9-6-DM1 con el fármaco maitansina libre en ratones SCID que portan xenoinjertos HL-60 (A). El peso corporal de los ratones se monitorizó como una indicación de toxicidad (B). Los tumores con recaída en dos ratones tratados se trataron con un segundo curso de My9-6-DM1.

Las Figuras 23A y B muestran una comparación de la eficacia anti-tumoral de My9-6-DM1 con quimioterapia estándar en ratones SCID que portan xenoinjertos grandes HL-60 (A). El peso corporal de los ratones se monitorizó como una indicación de toxicidad (B). Los tumores con recaída en dos ratones tratados se volvieron a tratar con un segundo curso de My9-6-DM1.

30 Las Figuras 24A y B muestran la eficacia anti-tumoral de My9-6-DM1 comparada con Gemtuzumab ozogamicina y quimioterapia estándar en un modelo de supervivencia HL-60. Las células HL-60 se inyectaron intravenosamente en ratones SCID. Los tratamientos indicados comenzaron 11 días después de la inyección de las células. Los tratamientos fueron i.v. diariamente x 5 excepto para Gemtuzumab ozogamicina (Q4Dx3).

### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona un nuevo anticuerpo murino anti-CD33 y versiones humanizadas de este anticuerpo, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Además, se proporcionan anticuerpos que comprenden una o más CDR del anticuerpo murino anti-CD33 o versión humanizada de éste que reconocen y se unen específicamente a CD33, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

#### Anticuerpo murino My9-6

40 El anticuerpo murino anti-CD33 de la presente invención, designado de varias maneras en la presente memoria como "My9-6", "My9-6 murino" y "muMy9-6", se caracteriza completamente respecto a la secuencia de aminoácidos de línea germinal posible de las regiones variables tanto de cadena ligera como pesada (Figura 10), secuencias de aminoácidos de las regiones variables tanto de cadena ligera como pesada (Figuras 8A y B), la identificación de las CDR (Figura 9), la identificación de los aminoácidos de superficie (Figuras 13A y B), y medios para su expresión en forma recombinante.

El anticuerpo My9-6 se ha caracterizado además funcionalmente y se ha mostrado que se une con alta afinidad a CD33 en la superficie de células U-937 positivas para CD33 (Figura 1). My9-6 marcado con  $^{125}\text{I}$  se une a células U-937 y se elimina por competición de las células por My9-6 no marcado y el anticuerpo anti-CD33 My9 caracterizado previamente (BioGenex, no. cat. 267M).

50 El término "región variable" se usa en la presente memoria para describir determinadas posiciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpo que se diferencian en secuencia entre anticuerpos y que cooperan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno. La variabilidad no está distribuida

habitualmente de forma uniforme a lo largo de las regiones variables de anticuerpo. Está concentrada normalmente en tres segmentos de una región variable denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en las regiones variables de cadena ligera como cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de las regiones variables se denominan las regiones marco. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cuatro regiones marco, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, con cada región marco conectada por tres CDR, que forman bucles conectando la estructura de lámina beta, y en algunos casos formando parte de la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen muy cerca por las regiones marco y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (E. A. Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, 1991, NIH).

La región "constante" no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presenta varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

### **Anticuerpo My9-6 humanizado**

También se han preparado versiones humanizadas de My9-6, designadas de varias maneras en la presente memoria como "huMy9-6", y "My9-6 humanizado".

El objetivo de la humanización es la reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un anticuerpo murino, para introducción en un ser humano, mientras se mantiene la afinidad y especificidad completas para unión a antígeno del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando varias tecnologías tales como modificación de superficie e injerto de CDR. Tal y como se usa en la presente memoria, la tecnología de modificación de superficie usa una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no CDR de regiones variables de anticuerpo para parecerse a las superficies de anticuerpos conocidos del huésped diana.

Las estrategias y métodos para modificar la superficie de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos en un huésped diferente, se describen en la Patente US 5.639.641 (Pedersen et al.). Brevemente, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de posición de un combinado de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo para proporcionar un conjunto de posiciones expuestas en la superficie del marco de región variable de cadena pesada y ligera en el que las posiciones de alineamiento para todas las regiones variables son al menos aproximadamente 98 % idénticas; (2) se define un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de región variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo de roedor (o fragmento de éste); (3) se identifica un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de región variable de cadena pesada y ligera que es el más idéntico al conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de roedor; (4) el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de región variable de cadena pesada y ligera definidos en la etapa (2) se sustituye con el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de región variable de cadena pesada y ligera identificado en la etapa (3), excepto aquellos residuos de aminoácidos que están en 5 Å de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

Los anticuerpos pueden humanizarse usando otras varias técnicas incluyendo injerto de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; Pat. U.S. Nos. 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación de superficie (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska M. A. et al., 1994, *PNAS* 91:969-973), e intercambio de cadenas (Pat. U.S. No. 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden prepararse por varios métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de exposición en fago. Véase también Pat. U.S. Nos. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las publicaciones de solicitud de patente internacional números WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Como se describe adicionalmente en la presente memoria, las CDR de My9-6 se identificaron por modelado y se predijeron sus estructuras moleculares. Los anticuerpos My9-6 humanizados se prepararon y se han caracterizado completamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de un número de anticuerpos huMy9-6 se muestran en la Figura 16A y 16B. Los valores de unión comparativos para anticuerpos My9-6 murinos y humanizados se proporcionan en la Figura 17. Las curvas de unión para los anticuerpos se muestran en la Figura 18.

### **Fragmentos de unión a epítipo de los anticuerpos My9-6**

Aunque los fragmentos de unión a epítipo del anticuerpo murino My9-6 y los anticuerpos My9-6 humanizados se discuten en la presente memoria separadamente del anticuerpo murino My9-6 y las versiones humanizadas de éste, se entiende que el término "anticuerpo" o "anticuerpos" de la presente invención puede incluir tanto los anticuerpos muMy9-6 como huMy9-6 de longitud completa así como fragmentos de unión a epítipo de estos anticuerpos.

Tal y como se usa en la presente memoria, "fragmentos de anticuerpo" incluye cualquier parte de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse a CD33, denominados generalmente "fragmentos de unión a epítipo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen preferiblemente, pero no están limitados a, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>. Los fragmentos de unión a epítipo, incluyendo anticuerpos de cadena única, pueden comprender sólo la o las regiones variables o en combinación con toda o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>.

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo contienen todas las seis CDR del anticuerpo completo, aunque también son funcionales los fragmentos que contienen menos de todas de dichas regiones, tales como tres, cuatro o cinco CDR. Además, los equivalentes funcionales pueden ser o pueden combinar miembros de una cualquiera de las clases de inmunoglobulina siguientes: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de éstas.

Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> pueden producirse por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos F(ab')<sub>2</sub>).

Los fragmentos Fv de cadena única (scFv) son fragmentos de unión a epítipo que contienen al menos un fragmento de una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V<sub>H</sub>) unido a al menos un fragmento de una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V<sub>L</sub>). El conector puede ser un péptido corto, flexible, seleccionado para asegurar que se produce el plegamiento tridimensional apropiado de las regiones (V<sub>L</sub>) y (V<sub>H</sub>) una vez se han unido de manera que se mantiene la especificidad de unión a la molécula diana del anticuerpo completo del que se obtiene el fragmento de anticuerpo de cadena única. El extremo carboxilo de la secuencia (V<sub>L</sub>) o (V<sub>H</sub>) puede estar unido covalentemente por un conector al extremo aminoácido de una secuencia (V<sub>L</sub>) y (V<sub>H</sub>) complementaria. Los fragmentos de anticuerpo de cadena única pueden generarse por clonación molecular, biblioteca de anticuerpo de exposición en fago o técnicas similares muy conocidas para el experto en la técnica. Estas proteínas pueden producirse, por ejemplo, en células eucariotas o células procariotas, incluyendo bacterias.

Los fragmentos de unión a epítipo de la presente invención también pueden generarse usando varios métodos de exposición en fago conocidos en la técnica. En los métodos de exposición en fago, los dominios funcionales de anticuerpo se presentan en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, dicho fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a epítipo expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpo combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a epítipo que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando CD33 marcado o CD33 unido o capturado en una superficie sólida o lecho. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos incluyendo dominios de unión fd y M13 expresados de fagos con los dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro fusionados recombinantemente bien a la proteína del gen III o gen VIII del fago.

Los ejemplos de métodos de exposición en fago que pueden usarse para preparar fragmentos de unión a epítipo de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187:9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280; solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Pat. U.S. Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Después de la selección de fagos, las regiones del fago que codifican los fragmentos pueden aislarse y usarse para generar los fragmentos de unión a epítipo a través de la expresión en un huésped elegido, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de planta, levadura, y bacterias, usando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques* 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI* 34:26-34; y Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043; incorporándose dichas referencias por referencia en sus totalidades. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv de cadena única y anticuerpos incluyen las descritas en Pat. U.S. Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu et al., 1993, *PNAS* 90:7995-7999; Skerra et al., 1988, *Science* 240:1038-1040.

### Equivalentes funcionales

También se incluyen en el alcance de la invención equivalentes funcionales del anticuerpo My9-6 y los anticuerpos My9-6 humanizados. El término "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos modificados y anticuerpos artificiales, por ejemplo, en el que cada equivalente funcional se define por su capacidad de unirse a CD33. El experto en la técnica entenderá que existe una superposición en el grupo de moléculas denominadas "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales".

Los anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen identidad u homología de secuencia con secuencias de aminoácidos de los anticuerpos My9-6 murino y My9-6 humanizado de la presente invención. Preferiblemente, la identidad es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos My9-6 murino y My9-6 humanizado de la presente invención. "Identidad de secuencia" y "homología de secuencia" como se aplican a una secuencia de aminoácidos en la presente memoria se define como una secuencia con al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, ó 94 % de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, ó 99 % de identidad de secuencia con otra secuencia de aminoácidos, según se determina, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988).

Tal y como se usa en la presente memoria, un anticuerpo quimérico es uno en el que diferentes partes de un anticuerpo derivan de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino emparejada con una región constante de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Pat. U.S. Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, fragmentos divalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes y mru (véanse las revisiones por Winter, G. y Milstein, C., 1991, *Nature* 349: 293-299; Hudson, P. J., 1999, *Current Opinion in Immunology* 11: 548-557), cada uno de los cuales tiene capacidad de unión a antígeno. En el fragmento Fv de cadena única (scFv), los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo se unen por un péptido flexible. Normalmente, este péptido conector tiene una longitud de aproximadamente 15 aminoácidos. Si el conector es mucho más pequeño, por ejemplo 5 aminoácidos, se forman fragmentos divalentes, que son dímeros scFv divalentes. Si el conector se reduce a menos de tres residuos de aminoácidos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se denominan fragmentos trivalentes y fragmentos tetravalentes. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, normalmente la CDR2 de la cadena pesada que tiene un reconocimiento y unión específica suficiente como para usarla separadamente. Dicho fragmento se denomina una unidad de reconocimiento molecular o mru. Varias de dichas mru pueden unirse entre sí con péptidos conectores cortos, formando por lo tanto una proteína de unión artificial con mayor avidez que un único mru.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. La unión covalente no evita que el anticuerpo genere una respuesta anti-idiotípica. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los equivalentes funcionales pueden producirse intercambiando diferentes CDR en diferentes cadenas en diferentes marcos. Así, por ejemplo, diferentes clases de anticuerpo son posibles para un conjunto dado de CDR por sustitución de diferentes cadenas pesadas, mediante lo cual pueden producirse, por ejemplo, los tipos e isotipos de anticuerpo IgG<sub>1-4</sub>, IgM, IgA<sub>1-2</sub>, IgD, IgE. De manera similar, pueden producirse anticuerpos artificiales en el alcance de la invención incluyendo un conjunto dado de CDR en un marco completamente sintético.

Los equivalentes funcionales pueden producirse fácilmente por mutación, delección y/o inserción en las secuencias de región variable y/o constante que flanquean un conjunto particular de CDR, usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente invención engloban aquellas moléculas con un grado detectable de unión a CD33, cuando se comparan con el anticuerpo murino My9-6. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos 10-100 %, preferiblemente al menos 50 %, 60 % ó 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ó 99 % de la capacidad de unión del anticuerpo murino My9-6 a CD33.

### **Anticuerpos mejorados**

Las CDR son de gran importancia para el reconocimiento del epítipo y unión del anticuerpo. Sin embargo, pueden hacerse cambios en los residuos que comprenden las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo de reconocer y unirse a su epítipo cognado. Por ejemplo, pueden hacerse cambios que no afectan el reconocimiento del epítipo, y aún así incrementan la afinidad de unión del anticuerpo para el epítipo.

Así, también están incluidas en el alcance de la presente invención las versiones mejoradas tanto de los anticuerpos murinos como humanizados, que también reconocen y se unen específicamente a CD33, preferiblemente con afinidad incrementada.

Varios estudios han examinado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en varias posiciones en la secuencia de un anticuerpo, tomando como base el conocimiento de la secuencia del anticuerpo primario y sus

propiedades tales como unión y nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16, 535-539).

5 En estos estudios, se han generado equivalentes del anticuerpo primario cambiando las secuencias de los genes de cadena pesada y ligera en las regiones CDR1, CDR2, CDR3, o marco, usando métodos tales como mutagénesis dirigida a sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de casete, PCR tendente a error, intercambio de cadenas de ADN, o cepas mutadoras de *E. coli* (Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16, 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Capítulo 16, p. 277-291, en "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos de cambiar la secuencia del anticuerpo primario han resultado en afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 27622-27628).

15 Mediante una estrategia dirigida similar de cambiar uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo, las secuencias de anticuerpo descritas en la presente memoria pueden usarse para desarrollar anticuerpos anti-CD33 con funciones mejoradas, incluyendo afinidad mejorada para CD33.

Los anticuerpos mejorados también incluyen aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan por técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridomas y selección para anticuerpos con características específicas.

## 20 Inmunoconjugados

La presente invención también está dirigida a inmunoconjugados, que comprenden los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos descritos en la presente memoria, unidos a un fármaco o profármaco. Los fármacos o profármacos preferidos son agentes citotóxicos e incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 y análogos de CC-1065, dolastatina y análogos de dolastatina.

25 Los inmunoconjugados pueden prepararse por métodos *in vitro*. Con el fin de unir un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo conector. Los grupos conectores adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Los grupos conectores preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, los conjugados pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

35 Los maitansinoides y análogos de maitansinoide están entre los agentes citotóxicos preferidos. Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides adecuados se describen en las Patentes U.S. Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Respecto a los maitansinoides, el grupo conector puede comprender un grupo químico reactivo. En una realización preferida, el grupo químico reactivo puede unirse covalentemente al maitansinoide mediante un resto de unión de enlace disulfuro.

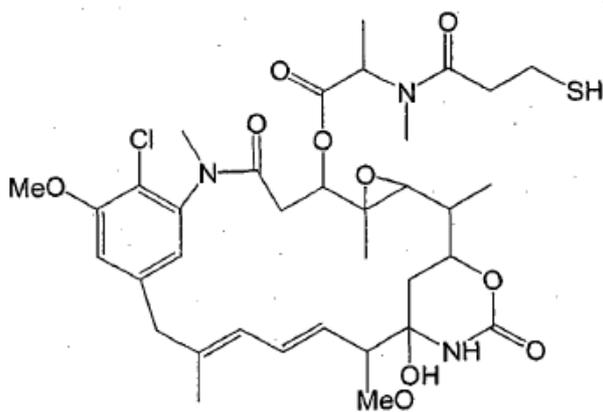
40 Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son ésteres de *N*-succinimidilo y ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un grupo conector que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 del maitansinol y sus análogos en los que el resto conector contiene un enlace disulfuro y el grupo químico reactivo comprende un éster de *N*-succinimidilo o de *N*-sulfosuccinimidilo.

45 Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para unir químicamente el resto conector. Por ejemplo, se espera que sean útiles la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y se prefiere especialmente la posición C-3 del maitansinol.

50 Otros enlaces químicos incluyen enlaces ácido lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles y enlaces esterasa lábiles. La descripción de la Patente U.S. No. 5.208.020, enseña la producción de maitansinoides que portan dichos enlaces.

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



Los taxanos también son agentes citotóxicos preferidos. Los taxanos adecuados para uso en la presente invención se describen en las Patentes U.S. Nos. 6.372.738 y 6.340.701. Los conjugados de los taxanos de la invención y un agente de unión a células pueden formarse usando cualesquiera técnicas conocidas actualmente o que se desarrollen posteriormente. Numerosos métodos de conjugación se enseñan en USP 5.416.064 y USP 5.475.092.

CC-1065 y sus análogos también son fármacos citotóxicos preferidos para uso en la presente invención. CC-1065 y sus análogos se describen en las Patentes U.S. Nos. 6.372.738; 6.340.701; 5.846.545; y 5.585.499. CC-1065 es un antibiótico anti-tumoral potente aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1.000 veces más potente *in vitro* que los fármacos anti-cancerosos usados comúnmente, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B. K. Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)).

Los fármacos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, caliqueamicina, dolastatina y análogos de dolastatina también son adecuados para la preparación de conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco también pueden unirse a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula vehicular intermedia tal como albúmina de suero.

#### 15 Inhibición del crecimiento de células que expresan CD33

También se incluyen en la presente invención métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CD33. Estos métodos usan los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención, así como los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen los que inhiben el crecimiento de una célula que expresa CD33 directamente o indirectamente.

Tal y como se usan en la presente memoria, debe entenderse que los términos "inhibe" o "que inhibe" incluyen cualquier efecto inhibitorio en el crecimiento celular, incluyen la muerte celular. Los efectos inhibitorios incluyen efectos temporales, efectos sostenidos y efectos permanentes.

#### Aplicaciones terapéuticas

La presente invención también incluye aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención, en el que los anticuerpos o inmunoconjugados pueden administrarse a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Pueden administrarse intravenosamente como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por rutas intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. También pueden administrarse por rutas intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos.

Una dosificación farmacéuticamente aceptable incluirá generalmente un agente farmacéuticamente aceptable tal como un vehículo, diluyente, y excipiente. Estos agentes son muy conocidos y el agente más apropiado puede ser determinado por los expertos en la técnica como según exija la situación clínica. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH ~7,4, que contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) 0,9 % solución salina (0,9 % p/v NaCl), y (3) 5 % (p/v) dextrosa.

En otras aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se co-administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos son aquellos agentes que buscan matar o limitar el crecimiento de células cancerosas a la vez que provocan un daño mínimo al huésped. Así, dichos agentes pueden explotar cualquier diferencia en las propiedades de la célula cancerosa (por ejemplo, metabolismo, vascularización o presentación de antígeno en la superficie celular) respecto a las células huésped sanas. Las diferencias en la morfología del tumor son sitios potenciales para la intervención. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un

anticuerpo tal como un anticuerpo anti-VEGF que es útil para retrasar la vascularización del interior de un tumor sólido, ralentizando de esta manera su velocidad de crecimiento.

Los agentes terapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a, agentes citotóxicos o citostáticos. El taxol es un agente terapéutico preferido que también es un agente citotóxico. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, auxiliares tales como granisetron HCl, inhibidores de andrógeno tales como acetato de leuprolida, antibióticos tales como doxorubicina, antiestrógenos tales como tamoxifeno, antimetabolitos tales como interferón alfa-2a, inhibidores de enzimas tales como inhibidor de ras farnesil-transferasa, inmunomoduladores tales como aldesleuquina, y derivados de mostaza de nitrógeno tales como melfalán HCl, y semejantes.

Cuando está presente en una forma de dosificación acuosa, en lugar de estar liofilizado, el anticuerpo se formulará normalmente a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo o conjugado dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si los anticuerpos se administran para propósitos preventivos o terapéuticos, el curso de terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el juicio del médico responsable. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 0,015 a 15 mg de anticuerpo/kg de peso del paciente es una dosificación inicial candidata para administración al paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y no se excluyen.

Las aplicaciones terapéuticas de la presente invención incluyen usos para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad. Las enfermedades tratadas con los métodos de la presente invención son aquellas caracterizadas por la expresión de CD33. Dichas enfermedades incluyen síndromes mielodisplásicos (MDS) y cánceres tales como leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia pro-mielocítica (PML). El experto en la técnica entenderá que los métodos de la presente invención también pueden usarse para tratar otras enfermedades todavía por describir pero caracterizadas por la expresión de CD33.

Las aplicaciones terapéuticas de la presente invención también pueden llevarse a la práctica *in vitro* o *ex vivo*.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen la purificación de poblaciones celulares contaminadas con células positivas para CD33 tales como células del linaje mieloide. El método comprende cultivar las poblaciones celulares en presencia de un inmunocombinado de My9-6 citotóxico y eliminar las células muertas positivas para CD33. Las condiciones para uso *in vitro* no clínico son muy conocidas (véase, por ejemplo, Uckun et al., 1986, *J Exp. Med.* 163, 347-368; Uckun et al., 1985, *J. Immunol.* 134, 3504-3515; Ramakrishnan et al., 1985, *J. Immunol.* 3616-3622).

Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* incluyen el tratamiento de médula ósea autóloga antes de su infusión en el mismo paciente con el fin de matar las células del linaje mieloide enfermas o malignas (Roy D. C. et al., 1995, *J. Clin. Immunol.* 15, 51-57).

### Aplicaciones en diagnóstico e investigación

Además de los usos terapéuticos de los anticuerpos discutidos en la presente memoria, los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en muchas aplicaciones de diagnóstico e investigación conocidas. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, en la purificación, detección y direccionamiento de CD33, incluidos en métodos de diagnóstico tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse en inmunoensayos para medir cualitativamente y cuantitativamente los niveles de CD33 expresados por células en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. 1988).

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de unión competitiva, ensayos en sandwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, p. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

Los anticuerpos de la invención también son útiles para la formación de imágenes *in vivo*, en el que un anticuerpo marcado con un resto detectable tal como un agente radio-opaco o radioisótopo se administra a un sujeto, preferiblemente en la corriente sanguínea, y se ensaya la presencia y localización del anticuerpo marcado en el huésped. Esta técnica de formación de imágenes es útil en la estadificación y tratamiento de malignidades. El anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un huésped, bien por resonancia magnética nuclear, radiología, u otro medio de detección conocido en la técnica.

El marcador puede ser cualquier resto detectable que es capaz de producir, bien directamente o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el marcador puede ser un marcador de biotina, un marcador enzimático (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y peroxidasa de rábano), un radio-marcador (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , y  $^{125}\text{I}$ ), un fluoróforo tal como un compuesto fluorescente o quimioluminiscente (por ejemplo, isotiocianato de

fluoresceína, rodamina), un agente formador de imágenes (por ejemplo, Tc-m99 e indio (<sup>111</sup>In)) y un ión metálico (por ejemplo, galio y europio).

5 Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para la conjugación del anticuerpo al marcador, incluyendo los métodos descritos por Hunter, et al., 1962, *Nature* 144:945; David et al., 1974, *Biochemistry* 13:1014; Pain et al., 1981, *J. Immunol. Meth.* 40:219; Nygren, J., 1982, *Histochem. and Cytochem.* 30:407.

Los anticuerpos de la invención también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como resina Sefadex o papel de filtro, usando métodos muy conocidos en la técnica. Así, CD33 puede aislarse y purificarse de una muestra biológica.

**Polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos para preparar el anticuerpo**

10 La presente invención proporciona además polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos de unión a epítipo de éste, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 También se describen polinucleótidos que codifican un polipéptido que puede unirse a CD33 y que hibridan en condiciones de hibridación astringentes con polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención, en el que dichas condiciones de hibridación astringentes incluyen: pre-hibridación durante 2 horas a 60°C en 6x SSC, 0,5 % SDS, 5x solución de Denhardt, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado con calor; hibridación durante 18 horas a 60°C; lavado dos veces en 4x SSC, 0,5 % SDS, 0,1 % pirofosfato de sodio, durante 30 min a 60°C y dos veces en 2x SSC, 0,1 % SDS durante 30 min a 60°C.

20 Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17:242) que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligación de estos oligonucleótidos, y amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

25 Los métodos para la construcción de vectores recombinantes que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo y las señales de control de la transcripción y traducción apropiadas son muy conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. La invención, así, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención, o una cadena pesada o ligera de ésta, o un dominio variable de  
30 cadena pesada o ligera, o un fragmento de unión a epítipo de cualquiera de éstos, unido de manera operativa a un promotor.

El vector recombinante se transfiere a una célula huésped por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Así, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a  
35 epítipo de éste, unido de manera operativa a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera pueden co-expresarse en la célula huésped para la expresión de una molécula completa de inmunoglobulina.

Puede utilizarse varios sistemas de vector de expresión en huésped para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión en huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificadoras de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que  
40 pueden expresar, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de nucleótidos codificadoras apropiadas, una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo; sistemas de células de planta infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión  
45 plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia).

55 Preferiblemente, se usan las células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo completa recombinante, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio

principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

Para la producción a largo plazo con alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden prepararse por ingeniería líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células preparadas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después cambiarlas a medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan para formar foci que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para preparar por ingeniería líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares preparadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interaccionan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Una vez la molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de Proteína A, y en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

## EJEMPLOS

La invención se describe ahora por referencia a los ejemplos siguientes, que sólo son ilustrativos, y no se pretende que limiten la presente invención.

### Ejemplo 1. Anticuerpo murino My9-6

En este primer ejemplo, se describe la estructura de aminoácidos primaria completa y secuencia de ADNc del anticuerpo murino My9-6 de la presente invención, junto con sus propiedades de unión y medios para su expresión en forma recombinante. De acuerdo con esto, se proporciona una descripción total y completa de un anticuerpo de la invención y su preparación, de manera que un experto en la técnica inmunológica será capaz de preparar dicho anticuerpo sin experimentación innecesaria.

#### 1.1. Generación, producción y caracterización del anticuerpo My9-6

Para la inmunización se usó una línea celular de fibroblastos murinos 3T3 transfectada con el antígeno CD33.

Se inmunizaron ratones hembra BABL/c, de 5 meses de edad, intraperitonealmente en el día 0 con la línea celular de fibroblastos murinos 3T3 transfectada ( $2,5 \times 10^6$  células, suspendidas en 0,2 mL PBS). Los animales se reforzaron con 0,2 mL de suspensión celular como sigue: día 13,  $5 \times 10^6$  células, día 21  $5 \times 10^6$  células. En el día 24, se sacrificó un ratón y se retiró su bazo.

El bazo se trituró entre dos portas de vidrio congelados para obtener una suspensión de células únicas, que se lavó con medio RPMI sin suero que contenía penicilina y estreptomina (SFM). El sedimento de células del bazo se resuspendió en 10 mL de 0,83 % (p/v) solución de cloruro de amonio en agua durante 10 min en hielo para lisar las células sanguíneas rojas, y se lavó con medio sin suero (SFM). Las células del bazo ( $1,6 \times 10^8$ ) se combinaron con células de mieloma ( $5,4 \times 10^7$ ) de la línea celular de mieloma de ratón no secretora P3X63Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD.; no. de cat. CRL1580) en un tubo, y se lavó con medio RPMI-1640 sin suero (SFM). El sobrenadante se retiró y el sedimento celular se diluyó hasta  $2 \times 10^7$  células/mL. Las células se plaquearon a  $2 \times 10^7$  células/placa en placas de cultivo tisular que se recubrieron con 15 mg/mL de concanavalina A. Las placas se incubaron durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se retiró cuidadosamente de las placas. Se añadió lentamente gota a gota un mL de solución de polietileno glicol (40 % PEG p/v). Las placas se rotaron y se incubaron durante 30 segundos. El PEG se retiró y se desechó. Las placas se lavaron dos veces añadiendo lentamente 5 mL de SFM y desechando. Después del lavado final, se añadieron 5 mL de SFM suplementado con 5 % Suero Bovino Fetal (FBS). Las placas se incubaron toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ . Después de la incubación, las células se rasparon de las placas con un raspador celular y se combinaron. Las placas se lavaron y se combinó con las células. Las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en medio de crecimiento RPMI-1640 suplementado con 5 % FBS, penicilina-estreptomina e hipoxantina/aminopterin/timidina (HAT). Las células se plaquearon a  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos que contenían una capa de alimentación de macrófagos. Las condiciones generales para la inmunización y producción de hibridomas fueron como describen J. Langone y H. Vunakis (Eds., Methods in Enzymology, Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"; 1986; Academic Press, Florida) y E. Harlow y D. Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). También pueden usarse otras técnicas de inmunización y producción de hibridomas, como son conocidas para los expertos en la técnica.

Los sobrenadantes de los cultivos de los clones de hibridoma se cribaron para unión a células transfectadas con el antígeno CD33 y la línea celular de linfoma histiocítico humano, U-937 (ATCC CRL-1953.2) y para ausencia de unión a una línea celular de fibroblastos de ratón. Estos clones se expandieron y subclonaron. Los sobrenadantes de los cultivos de los subclones se cribaron adicionalmente con los ensayos de unión anteriores. Mediante este procedimiento, se seleccionó el subclón 3E7-H2-3D8 (My9-6), y los genes de cadena pesada y ligera se clonaron y secuenciaron como se describe más adelante.

El cribado de los sobrenadantes de hibridoma para la unión específica al antígeno CD33 se llevó a cabo usando ELISA en las líneas celulares que expresaban este antígeno y en una línea celular negativa para este antígeno. Las células se recogieron separadamente de los matraces de cultivo celular, se suspendieron en medio de crecimiento que contenía 10 % FBS, se sedimentaron por centrifugación, y se lavaron con PBS. Las células lavadas (100  $\mu$ L de aproximadamente  $1-3 \times 10^6$  células/mL) se añadieron a pocillos de una placa Immulon-2HB recubierta con fitohemaglutinina (100  $\mu$ L de 20  $\mu$ g/mL PHA), se centrifugaron y se dejó que se adhirieran a los pocillos recubiertos con PHA durante 10 min. La placa con las células se giró rápido para eliminar el PBS y se secó toda la noche a 37°C. Los pocillos se bloquearon con 5 mg/mL solución de BSA en PBS durante 1 h a 37°C y se lavaron cuidadosamente con PBS. Se añadieron alícuotas de los sobrenadantes de los clones de hibridoma (100  $\mu$ L; diluido en tampón de bloqueo) a los pocillos que contenían células que expresaban el antígeno CD33 y a células que no expresaban CD33, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Los pocillos se lavaron con PBS, se incubaron con conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-peroxidasa de rábano (100  $\mu$ L; en tampón de bloqueo) durante 1 h, seguido de lavados y la unión se detectó usando un sustrato ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un sobrenadante típico de un subclón de hibridoma 3E7 después de incubación con células que sobreexpresaban el antígeno CD33 rindió una señal de 0,50 unidades de absorbancia, a diferencia de un valor de 0,10 unidades de absorbancia obtenido después de incubación con células negativas para el antígeno CD33.

El hibridoma se creció en ascitis en ratones BALB/c. Se descongeló un vial de células de hibridoma congeladas y las células se expandieron en matraces de cultivo tisular para obtener el número de células necesario para la producción de ascitis. Se inyectó a ratones BALB/c ya inoculados (se había inyectado a los ratones 0,5 mL de pristano 10-14 días antes) i.p.  $1 \times 10^6$  células en 0,5 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Doce a 18 días después de la inyección de las células, se retiró el fluido de ascitis de la cavidad peritoneal de los ratones con una jeringa. El fluido de ascitis combinado se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se sometió a centrifugación a 12.000 rpm durante 30 minutos. El anticuerpo se purificó del sobrenadante aclarado como sigue: Etapa 1: precipitación con sulfato de amonio. El sobrenadante en hielo se diluyó con dos volúmenes de PBS frío, se agitó y se trató lentamente con un volumen de solución de sulfato de amonio fría, saturada (100 %). La solución se dejó estar en hielo durante aproximadamente 5 horas, cuando el precipitado se recogió por centrifugación. El sedimento se disolvió en una pequeña cantidad de PBS y la solución resultante se dializó en el tampón para la etapa de purificación por afinidad con proteína A. Etapa 2: Purificación por afinidad en Sefarosa-Proteína A. El isotipo de My9-6 murino es IgG1 con una cadena ligera kappa. Por lo tanto, la columna de afinidad se equilibró en tampón 0,1 M tris.HCl que contenía 3 M NaCl, pH 8,0. La solución de anticuerpo en el mismo tampón se pasó a través de la columna, la columna se lavó bien con el tampón de equilibrado y se eluyó con 0,1 M ácido acético que contenía 0,15 M NaCl. Se ensayaron fracciones midiendo la absorción UV a 280 nm. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron, se neutralizaron con 1 M tris y se dializaron en PBS para uso y almacenamiento.

El anticuerpo purificado se caracterizó inicialmente para unión a células que expresaban CD33, tales como la línea celular de fibroblastos murinos 3T3 transfectada y la línea celular humana U-937, y la ausencia de unión a líneas celulares negativas para el antígeno como se ha descrito anteriormente para el cribado de los sobrenadantes de hibridoma.

Para averiguar adicionalmente su especificidad para la unión al antígeno CD33, se llevó a cabo un experimento de unión competitiva entre muMy9-6 marcado y el anticuerpo anti-CD33 My9 disponible comercialmente. El experimento de unión se llevó a cabo usando el método descrito por Goldmacher et al. (1989, *J. Cell. Physiol.* 141, 222-234). El anticuerpo murino My9-6 se radiomarcó con <sup>125</sup>I usando la técnica de Yodo-gen (Fraker, P. J. y Speck, J. C., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857). Una cantidad constante ( $3 \times 10^{-9}$ M) de muMy9-6 marcado con <sup>125</sup>I se mezcló con concentraciones crecientes de anticuerpo no radiactivo, bien muMy9-6 no marcado o My9 no marcado, y las mezclas se incubaron con células ( $1 \times 10^6$  células por muestra) a 4°C durante 30 min. Estas incubaciones se hicieron en 60  $\mu$ L de un tampón que consistía en Medio Esencial Mínimo Modificado para Cultivos en Suspensión (SMEM) suplementado con 2,5 % suero humano. Las células se separaron del medio que contenía material no unido por centrifugación a través de una mezcla de aceite de silicona (Aldrich) y aceite de parafina (Baker) con una densidad de 1,009 g/ml. El sedimento celular se retiró cortando los tubos de centrifuga en la interfase de aceite y se usó para medir la radiactividad asociada a células en un contador gamma (modelo RIAgamma 1274 de LKB). La radiactividad asociada a células medida se representó frente a las concentraciones de anticuerpos competidores no marcados. Los resultados se muestran en la Figura 1: ambos anticuerpos, My9 y My9-6, proporcionan curvas de unión de competición similares. Esto demuestra que My9 y My9-6 se unen al mismo antígeno y además que ambos anticuerpos tienen avideces de unión muy similares. Como My9 es un anti-CD33 estándar publicado y reconocido se concluyó que My9-6 es un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo My9 está disponible comercialmente en BioGenex (San Ramon, Ca 94583; no. de cat. AM267-5M).

## 1.2. Clonación de los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo My9-6

El ARN total se purificó de un matraz T175 confluyente de células de hibridoma My9-6 como se describe en Molecular Protocols (NB1455-p173). La integridad del ARN se evaluó en un gel 1 % MOPS y se determinaron las concentraciones por espectrofotometría UV. Las reacciones de RT se hicieron con 4-5 µg ARN total usando el kit Gibco Superscript II y bien oligo dT o cebadores hexámero aleatorios.

- 5 Las reacciones de PCR se hicieron tanto usando un método RACE descrito en Co et al. (1992, *J. Immunol.* 148(4):1149-54) como usando cebadores degenerados descritos en Wang et al. (2000, *J. Immunol. Methods.* 233:167-177). La RACE PCR requirió una etapa intermedia para añadir una cola poli dG en los extremos 3' de los ADNc de primera cadena. Las reacciones de RT se purificaron con columnas Qianeasy (Qiagen) y se eluyeron en 50 µl tampón 1 x NEB 4. Una reacción de poner cola dG se hizo en el eluato con 0,25 mM CoCl<sub>2</sub>, 1 mM dGTP, y 5 unidades de transferasa terminal (NEB), en tampón 1 x NEB 4. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y se añadió 1/5 de la mezcla de reacción (10 µl) directamente a una mezcla de reacción de PCR para servir como el ADN molde.

- 15 Las reacciones RACE y PCR degenerada fueron idénticas excepto por las diferencia en cebadores y molde. Como se ha mencionado anteriormente, la mezcla de reacción de transferasa terminal se usó directamente para el molde RACE PCR, mientras la mezcla de reacción de RT se usó directamente para las reacciones de PCR degenerada. En ambos conjuntos de reacciones se usaron el mismo cebador de cadena ligera 3', HindKL:

**TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO:11)**

y cebador de cadena pesada 3', Bgl2IlgG1:

**GGAAGATCTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEQ ID NO:12)**

- 20 En la RACE PCR, se usó un cebador poli dC 5' tanto para la cadena pesada como ligera, EcoPolydC: TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO:13), mientras los cebadores de PCR de extremo 5' degenerados fueron Sac1MK: GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO:14) para la cadena ligera y una mezcla igual de EcoR1MH1: CTTCGGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO:15) y EcoR1MH2: CTTCGGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO:16) para la cadena pesada (bases mixtas: H= A+T+C, S= G+C, Y= C+T, K= G+T, M= A+C, R= A+G, W= A+T, V= A+C+G, N= A+T+G+C).

- 25 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ research usando un programa adaptado de Wang et al. (2000, *J. Immunol. Methods.* 233:167-177): 1) 94°C., 3 min; 2) 94°C., 15 seg; 3) 45°C., 1 min; 4) 72°C., 2 min; 5) ciclar atrás a etapa #2 29 veces; 6) finalización con una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se clonaron en pBluescript II SK+ (Stratagene) usando enzimas de restricción creadas por los cebadores PCR. Los clones de cadena pesada y ligera se secuenciaron por los servicios de secuenciación de Lark Technologies o Seqwright.

- 30 La RACE PCR nunca tuvo éxito para la cadena ligera de My9-6. Así, con el fin de confirmar las secuencias de ADNc de extremo 5', se hizo PCR degenerada y clonación adicionales. La secuencia de ADNc de cadena ligera de My9-6, determinada a partir de los clones de PCR degenerada, se introdujeron en el sitio de internet de búsqueda Blast de NCBI ([ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) y se salvaron las cinco mejores secuencias de anticuerpo murino con secuencia señal enviada. Se diseñaron cebadores de PCR degenerada a partir de estos péptidos señal usando el software de internet Codehop ([blocks.fhcrc.org/codehop.html](http://blocks.fhcrc.org/codehop.html)). Se añadieron sitios de restricción EcoRI a tres de los cebadores degenerados Codehop (Figura 2) y éstos se usaron en reacciones de RT-PCR como se ha descrito anteriormente.

### 1.3. Preparación y secuenciación de las muestras de cadena pesada y ligera

- 40 Las cadenas pesada y ligera del anticuerpo muMy9-6 se separaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. El anticuerpo reducido y desnaturalizado se sometió a electroforesis en un gel 12 % Tris-glicina (Novex, San Diego, CA). Después de la electroforesis, los geles se transfirieron a una membrana Immobilon<sup>PSQ</sup> usando tampón CAPS/MeOH. Después de la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau S. Las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada se escindieron para la secuenciación de proteínas.
- 45 La cadena ligera del anticuerpo se secuenció directamente de la membrana por química de degradación de Edman automatizada en un secuenciador ABI 494 Procise.

El extremo N de la cadena pesada se bloqueó, así la proteína se digirió, *in situ*, con tripsina según Gharahdaghi, et al. (1996). La mezcla digerida se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF en un instrumento Kratos Kompact SEQ. Los péptidos seleccionados se sometieron a MS/MS para determinar sus secuencias.

- 50 **Ejemplo 2. Humanización de la región variable del anticuerpo por modificación de superficie**

La modificación de superficie del anticuerpo My9-6 para proporcionar versiones humanizadas adecuadas como agentes terapéuticos o de diagnóstico se lleva a cabo generalmente según los principios y métodos descritos en la Patente U.S. 5.639.641, y como sigue.

### 2.1. Predicción de superficie

5 La accesibilidad al disolvente de los residuos de la región variable para un conjunto de anticuerpos con estructuras resueltas se usó para predecir los residuos de superficie para la región variable del anticuerpo murino My9-6. La accesibilidad al disolvente de los aminoácidos para un conjunto de 127 archivos de estructura de anticuerpo únicos (Figura 3) se calculó con el paquete de software MC (Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235(3): 959-973). Las diez  
10 secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada más similares de este conjunto de 127 estructuras se determinaron usando el software de alineamiento de secuencias en el sitio de internet NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La accesibilidad al disolvente media para cada residuo de la región variable de estas diez regiones variables de anticuerpo se calculó con una hoja de cálculo Excel y las posiciones con más de un 30 % de accesibilidad media se consideraron residuos de superficie. Las posiciones con accesibilidades medias de entre 25 % y 35 % se consideraron adicionalmente calculando la accesibilidad del residuo individual sólo para  
15 aquellas estructuras con dos residuos idénticos flanqueando a cada lado.

### 2.2. Modelado molecular

Se generó un modelo molecular de la región variable de My9-6 murino usando el paquete de software Oxford Molecular AbM. El marco del anticuerpo se construyó a partir de los archivos de estructura para los anticuerpos con las secuencias de aminoácidos más similares (1 sbs para la cadena ligera y 1bbj para la cadena pesada) y las CDR  
20 no canónicas se construyeron buscando una base de datos de estructura C-a que contenía estructuras resueltas no redundantes. Los modelos se vieron con el Visor GlaxoSmithKline Swiss-Pdb y se determinaron los residuos que se encontraban en 5' de una CDR.

### 2.3. Selección de anticuerpo humano

Las posiciones de superficie de la región variable de My9-6 murino se compararon con las posiciones correspondientes en secuencias de anticuerpos humanos en la base de datos Kabat (Johnson y Wu, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29(1): 205-6). El software SR de gestión de la base de datos de anticuerpos (Searle, 1998) se usó para  
25 extraer y alinear los residuos de superficie de parejas de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos naturales. La superficie de región variable de anticuerpo humano con los residuos de superficie más idénticos, proporcionándose una consideración especial a las posiciones que se encuentran en 5' de una CDR, se eligió para reemplazar los residuos de superficie de la región variable del anticuerpo murino My9-6.  
30

### 2.4. Construcción de gen de anticuerpo humanizado por mutagénesis por PCR

Se llevó a cabo mutagénesis por PCR en los clones de ADNc de la región variable de My9-6 murino en primer lugar para cambiar las secuencias del extremo 5' para que concuerden con la secuencia del péptido, y después construir el gen My9-6 humano modificado en superficie. Se diseñaron conjuntos de cebadores para crear los residuos  
35 murinos que no se habían secuenciado originalmente en los clones de PCR degenerados iniciales (posiciones de cadena ligera N1, M3, L4, y S7, y posiciones de cadena pesada Q3 y P7).

Se diseñaron conjuntos de cebadores de humanización para hacer los 6 cambios de aminoácidos requeridos para todas las versiones de huMy9-6 y se diseñaron cebadores adicionales para cambiar alternativamente los cuatro  
40 residuos 5' (Figura 4). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research con el programa siguiente: 1) 94°C., 1 min; 2) 94°C., 15 seg; 3) 55°C., 1 min; 4) 72°C., 1 min; 5) ciclar atrás a la etapa #2 29 veces; 6) finalización con una etapa de extensión final a 72°C durante 4 min. Los productos de PCR se digirieron con sus enzimas de restricción correspondientes y se clonaron en los vectores de clonación pBluescript. Los clones se secuenciaron para confirmar los cambios de aminoácidos.

### 2.5. Vector de expresión para los anticuerpos humanizados

45 Las secuencias emparejadas de cadena ligera y pesada se clonaron en un único vector de expresión de mamíferos. Los cebadores de PCR para las secuencias variables humanas crearon sitios de restricción que permitieron añadir la secuencia señal humana en el vector de clonación pBluescriptII. Las secuencias variables podían entonces clonarse en el plásmido de expresión de mamíferos con EcoRI y BsiWI o HindIII y ApaI para la cadena ligera o cadena pesada, respectivamente (Figura 5). Las secuencias variables de cadena ligera se clonaron en marco en la región  
50 constante IgKappa humana y las secuencias variables de cadena pesada se clonaron en la secuencia de región constante IgGamma1 humana. En los plásmidos de expresión finales, los promotores CMV humanos dirigen la expresión de las secuencias de ADNc tanto de la cadena ligera como pesada.

## 2.6. Expresión temporal de los anticuerpos humanizados

Las células 293T se cultivaron en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, BioWhittaker, 12-614F), 10 % suero bovino fetal inactivado con calor (Hyclone, SH30071.03), 4 mM L-glutamina (BioWhittaker, 17-604E) y 1 % mezcla penicilina-estreptomicina (BioWhittaker, 17-603E) bajo 6 % CO<sub>2</sub> en un incubador a 37°C. Las células se subcultivaron tres veces a la semana a una dilución 1:10 manteniendo una población sub-confluyente. 24 horas antes de la transfección, las células se tripsinizaron (BioWhittaker, 17-161E); las células vivas se contaron por el método de exclusión de azul de tripán y se plaquearon en placas tratadas de cultivo tisular de 10 cm (Corning, 430167) a una densidad de 2 x 10<sup>6</sup> células por placa. Inmediatamente antes de la transfección, las células se lavaron cuidadosamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS, diluido de BioWhittaker 10 x PBS, 17-517Q) y las células se pusieron sobre 7 mL de SFM de Hibridoma (InvitroGen, 12045-076) incluyendo 1 % Ultra Low IgG Serum (Gibco BRL, 16250-078).

Los métodos de transfección temporal se adaptaron del protocolo estándar de Qiagen Polyfect. Para transfectar una placa de 10 cm, se combinaron 8 µg de ADN grado CsCl con 300 µL de SFM de Hibridoma y 80 µL de reactivo de transfección Polyfect (Qiagen, 301107). La mezcla de transfección se agitó con vórtex durante aproximadamente 5 segundos a baja velocidad y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió 1 mL de SFM de Hibridoma, 1 % Ultra Low IgG Serum a la mezcla de transfección y se combinó pipeteando arriba y abajo aproximadamente cinco veces. La mezcla de transfección se añadió a los 7 mL de SFM de Hibridoma que cubría las células y las placas se giraron cuidadosamente para asegurar una distribución homogénea. Las reacciones de transfección se incubaron toda la noche, generalmente 16 horas, en un incubador de cultivo tisular. El medio de transfección se retiró cuidadosamente de las células y se reemplazó con 20 mL de SFM de Hibridoma, 1 % Ultra Low IgG Serum. Las células transfectadas se volvieron a poner en el incubador durante 72 horas, después de lo cual los sobrenadantes se recogieron y la producción de anticuerpo se cuantificó por ELISA. El sobrenadante recogido se almacenó a 4°C hasta la purificación.

## 2.7. Purificación de los anticuerpos humanizados

Se preparó sobrenadante para cromatografía de afinidad de Proteína A por la adición de 1/10 volumen de tampón 1 M Tris/HCl, pH 8,0. El sobrenadante con pH ajustado se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 µm y se cargó en una columna de Sefarosa de Proteína A (HiTrap Proteína A HP, 1 mL, Amersham Biosciences) equilibrada con tampón de unión (PBS, pH 7,3). Se conectó una pre-columna de Q-Sefarosa (10 mL) aguas arriba de la columna de Proteína A durante la carga de la muestra para reducir la contaminación de material celular tal como ADN. Después de cargar la muestra, la pre-columna se retiró y la orientación de la columna de Proteína A se revirtió para lavado y elución. La columna se lavó con tampón de unión hasta que se obtuvo una línea base estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se eluyó con tampón 0,1 M ácido acético que contenía 0,15 M NaCl, pH 2,8, usando una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,25 mL y se neutralizaron por la adición de 1/10 volumen de 1 M Tris/HCl, pH 8,0. La o las fracciones del pico se dializaron toda la noche frente a PBS, pH 7,3. La cantidad de anticuerpo se cuantificó midiendo la absorbancia a 280 nm y la concentración de anticuerpo se calculó asumiendo que E<sub>280</sub><sup>0,1%</sup> = 1,4. El análisis de los espectros de absorbancia y SDS-PGE se realizaron en fracciones de anticuerpo para verificar su pureza.

## Ejemplo 3. Ensayo de los anticuerpos humanizados

### 3.1. Crecimiento de células para los análisis de unión

Las células HL-60 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC# CCL-240). Se mantuvieron en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>, incubador con cubierta de agua a 37°C (Napco Scientific Co., Tualitan, Oregón). Las células se crecieron en medio RPMI suplementado con L-glutamina (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contenía 10 % suero fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah), más 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (Life Technologies, Grand Island, N.Y.).

### 3.2. Ensayo de unión directa en células HL-60

Las células HL-60 se recogieron de matraces T75 (NUNCLONTM, no. de cat. 153732), y se centrifugaron a aproximadamente 300 x g durante cinco minutos en una centrífuga de mesa Omnifuge RT (Haereus Separations, Alemania), a 4°C. Las células se resuspendieron a una densidad de 3 x 10<sup>6</sup> células por mL en tampón FACS, comprendido por 2 % (v/v) suero de cabra (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) en Medio MEM Alfa suplementado con L-glutamina (Life Technologies, Grand Island, N.Y.). Usando una pipeta multicanal, se añadieron 3 x 10<sup>5</sup> células a pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos Falcon (no. de cat. 3077) y se puso en hielo. Usando una placa de ensayo flexible de 96 pocillos Falcon (no. de cat. 353911), se prepararon once diluciones seriadas de dos veces de cada artículo de ensayo o control en duplicado en tampón FACS, a partir de una concentración de partida de 2 x 10<sup>-8</sup> M. Entonces, se mezclaron 100 µl bien del artículo de ensayo o control con las células. Los pocillos control sólo recibieron tampón FACS. La placa se incubó en hielo durante una hora, y se centrifugó durante cinco minutos a 300 x g en una centrífuga refrigerada. Los reactivos se retiraron de los pocillos de la placa por una inversión rápida sobre un vaso de precipitados de desecho que contenía 10 % de lejía. Las células se resuspendieron por agitación con vórtex suave, se lavaron una vez con tampón FACS frío, se centrifugaron y se resuspendieron con agitación con vórtex suave. Se diluyeron anti-IgG humana de cabra marcada con FITC (Jackson

ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, no. de cat. 109-096-003) y anti-IgG de ratón de cabra marcada con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, no. de cat. 109-095-088) 1:100 en tampón FACS, y se añadieron 100 µl a pocillos apropiados en la placa de ensayo. La placa se incubó durante una hora adicional en hielo, protegida de la luz. El anticuerpo secundario no unido se lavó de los pocillos de la misma manera que la descrita anteriormente. Las células se resuspendieron por agitación con vórtex suave, y se fijaron añadiendo 120 µl/pocillo de 1 % formaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10 mM fosfato de potasio, 150 mM cloruro de sodio, pH 7,2). La placa de ensayo se analizó en un citómetro de flujo FACScan conectado con un dispositivo de muestreo de 96 pocillos automatizado (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

### 3.3. Preparación de membranas plasmáticas

Se prepararon membranas plasmáticas según el procedimiento descrito en Vater et al. (1995). Brevemente, las células HL-60 se crecieron hasta una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL en RPMI suplementado con L-glutamina, que contenía 10 % suero fetal bovino, y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina. Cuando se obtuvo un total de  $1 \times 10^9$  células, las células se recogieron, se centrifugaron a aproximadamente 300 x g en una centrífuga Omnifuge RT, se lavaron con solución salina equilibrada de Hanks (Life Technologies, no. de cat. 14175-095), y se combinaron en un tubo de centrífuga cónico de 50 mL. El sedimento se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  durante al menos 24 horas, para facilitar la lisis celular y la homogeneización. Para preparar las membranas plasmáticas, el sedimento se descongeló rápidamente a  $37^\circ\text{C}$  y se almacenó en hielo; todas las etapas posteriores se realizaron a  $4^\circ\text{C}$ . El sedimento de células HL-60 se resuspendió en 8 mL de tampón 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, que contenía 1 mM EDTA, 0,25 M sacarosa y 1 mM fenilmetilsulfonil-fluoruro (PMSF). El sedimento celular se transfirió a un homogeneizador tisular Dounce de 15 mL (Wheaton, Millville, NJ) para la disrupción celular (20 golpes con un émbolo de vidrio de borosilicato con ajuste firme). El homogenado se centrifugó en una Centrífuga Superspeed Refrigerada Sorval RC-5B, usando un rotor SS-34 (Wilmington, DE) a 6.000 rpm durante diez minutos, y el sobrenadante se retiró cuidadosamente del sedimento. El sedimento se lavó una vez adicional con 8 mL de tampón y se procesó como se ha descrito anteriormente. Los sobrenadantes combinados se pusieron como una capa sobre 1 mL de 37 % tampón cojín de sacarosa en 10 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH 7,0, y se procesó adicionalmente en una ultracentrífuga pre-enfriada Beckman L8-M, con un rotor SW55ti (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), a 33.000 rpm durante 70 minutos. La capa de membrana opalescente, situada justo por encima del cojín de sacarosa, se retiró de cada tubo y se diluyó con cuatro volúmenes de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,0. Esta solución se centrifugó durante 30 minutos adicionales a 18.000 rpm en la ultracentrífuga. El sobrenadante se retiró cuidadosamente, y los sedimentos resultantes se resuspendieron en 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,0. La preparación de membrana de HL-60 se alicuotó en tubos Eppendorf estériles con tapa de rosca de 1,5 mL, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  para uso. La concentración de proteína total de la preparación final se determinó usando el Ensayo BCA de Pierce™ (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, no. de cat. 23235).

### 3.4. Ensayo de unión directa en membranas HL-60

Las membranas HL-60, preparadas como se ha descrito anteriormente, se secaron a una concentración de partida de 10 µg/mL en agua desionizada en la superficie de poliestireno de placas de ensayo de 96 pocillos Immulon 2 (Dyner Laboratories, Chantilly, VA), usando un desecador de vacío Labconco (Labconco, Corp, Kansas City, MO), toda la noche a temperatura ambiente. La placa ELISA se bloqueó con una solución de 1 % fracción V albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, no. de cat. A-3294), 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, no. de cat. P-2287) en solución salina tamponada con Tris (50 mM Tris-HCl, 150 mM cloruro de sodio, pH 7,5, TBS), 300 µL por pocillo, a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Después de esta etapa de bloqueo, la placa se drenó de tampón de bloqueo y se transfirió a toallas de papel. Se prepararon dos diluciones seriadas de tres veces de los reactivos de ensayo o control en tampón de bloqueo, en cuadruplicado, empezando a  $3,13 \times 10^{-9}$  M titulada hacia abajo hasta  $5,29 \times 10^{-14}$  M en una placa de ensayo flexible de 96 pocillos. Los pocillos de control negativo contenían tampón de bloqueo solo. Se transfirieron 50 µL de cada dilución a pocillos designados en la placa de ensayo recubierta de membrana que se incubó toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Los contenidos de los pocillos se aspiraron en un matraz de desecho que contenía 10 % (v/v) lejía, y la placa se lavó 3 x con TBS que contenía 0,1 % (v/v) Tween-20 (tampón de lavado) y se transfirió a toallas de papel. La cantidad de anticuerpo anti-My9-6 unido se detectó bien con anti-IgG de ratón de cabra-HRP o anti-IgG humana de burro-HRP diluido 1:1.000 con tampón de bloqueo en los pocillos apropiados. Estos anticuerpos secundarios se incubaron en la placa de ensayo durante una hora a temperatura ambiente, protegido de la luz. La placa se lavó y transfirió como anteriormente. La placa se reveló usando TMB (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, no. de cat. TMBW-0100-01), y se paró con solución de Parada (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, no. de cat. STPR-0100-01). La placa de ensayo se leyó a 450nm usando un lector de placas Titertek® Multiskan Plus MK II (Huntsville, AL).

### 3.5. Ensayo de unión de competición en membranas HL-60

Las membranas HL-60, preparadas como se ha descrito anteriormente, se secaron desde una concentración de partida de 10 µg/mL en agua desionizada en la superficie de poliestireno de placas de ensayo de 96 pocillos Immulon 2 (Dyner Laboratories, Chantilly, VA), usando un desecador de vacío Labconco (Labconco, Corp, Kansas City, MO), toda la noche a temperatura ambiente. La placa ELISA se bloqueó con una solución de 1 % fracción V albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., no. de cat. A-3294), 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, no. de cat. P-2287) en solución salina tamponada con Tris (50 mM tris, 150 mM cloruro de sodio,

pH 7,5, TBS), 300  $\mu$ l por pocillo a 37°C durante 1 hora. Después de esta etapa de bloqueo, la placa se drenó de tampón de bloqueo y se transfirió a toallas de papel. Se prepararon dos diluciones seriadas de dos veces de los reactivos de ensayo o control en tampón de bloqueo, en cuadruplicado, empezando a 1,25 x 10<sup>-8</sup> M titulada hacia abajo hasta 2,44 x 10<sup>-11</sup> M (2x la concentración final necesaria) en una placa de ensayo flexible de 96 pocillos. Estos reactivos de competidores no marcados se mezclaron con un volumen igual de 2,5 x 10<sup>-10</sup> M anti-My9-6 murino biotilado (ImmunoGen, Inc., Cambridge, MA); el control positivo no contenía reactivo de competidor, mientras el control negativo contenía tampón de bloqueo solo. Se transfirieron 50  $\mu$ L de estas mezclas a pocillos designados en la placa de ensayo recubierta de membrana que se incubó toda la noche a 4°C. Los contenidos de los pocillos se aspiraron en un matraz de desecho que contenía 10 % (v/v) lejía, y la placa se lavó 3 x con TBS que contenía 0,1 % (v/v) Tween-20 (tampón de lavado). La placa se transfirió a toallas de papel y la cantidad de anticuerpo anti-My9-6 murino biotilado unido se detectó con 100  $\mu$ L por pocillo de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, no. de cat. 016-050-084), diluida 1:5.000 en tampón de bloqueo. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz, el reactivo anticuerpo secundario no unido se lavó de los pocillos, y la placa se reveló usando TMB (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, no. de cat. TMBW-0100-01), y se paró con solución de Parada (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, no. de cat. STPR-0100-01). La placa de ensayo se leyó a 450 nm usando un lector de placas Titertek® Multiskan Plus MK II (Huntsville, AL).

### 3.6. Clonación de regiones variables del anticuerpo murino My9-6

Las regiones variables del anticuerpo murino My9-6 se clonaron por los métodos de RT-PCR descritos anteriormente. Varios clones individuales de cadena ligera y pesada se secuenciaron para identificar y evitar posibles errores de secuencia generados por la polimerasa. Sólo se obtuvo una única secuencia de la cadena ligera, pero se extrajeron dos secuencia separadas de los clones de RT-PCR de cadena pesada.

Para confirmar la secuencia real de la región variable de la cadena ligera de My9-6 murino, se analizaron secuencias de péptidos por degradación de Edman, Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) y Espectrometría de Masas en Tándem (MS-MS). Los 22 residuos en el extremo amino de la cadena ligera de My9-6 se secuenciaron por degradación de Edman y se proporcionan en la Figura 6A. La secuencia de ADNc inicial derivada de los clones de RT-PCR degenerados concordó en todos excepto cuatro residuos que se generaron probablemente por los cebadores degenerados. La secuencia peptídica determinada por la degradación de Edman se confirmó posteriormente por los clones de RT-PCR generados por cebadores degenerados en la secuencia del péptido señal del extremo 5'. El análisis por MS-MS de los fragmentos con digestión triptica también confirmó la secuencia de las CDR 1 y 2 de cadena ligera (Figura 6B). Conjuntamente, estos análisis peptídicos confirman la secuencia de aminoácidos predicha de la cadena ligera de My9-6 murino derivada de los clones de ADNc generados por RT-PCR.

Como es común con las secuencias de cadena pesada, el extremo amino de la cadena pesada de muMy9-6 estaba bloqueado por un residuo de piroglutamina y por lo tanto no pudo secuenciarse por la degradación de Edman N-terminal. En lugar de esto, se generaron datos de secuencia interna por digeridos tripticos y análisis por Desorción/ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) y Espectrometría de Masas en Tándem (MS-MS). Se identificó un fragmento de 1.788 daltons con una secuencia predicha idéntica a una parte del clon de ADNc 2 (Figura 7). Esta secuencia incluye cinco residuos de CDR3 para el clon de ADNc 2, y por lo tanto es un péptido ideal para hacer una identificación positiva para la cadena pesada de muMy9-6. Múltiples clones de RACE PCR que producían sólo la secuencia obtenida originalmente del clon 2 de RT-PCR degenerada también confirmaron esta secuencia peptídica.

Los resultados acumulativos de los distintos clones de ADNc y el análisis de la secuencia peptídica proporcionaron las secuencias finales de cadena ligera y pesada de My9-6 murino presentadas en la Figura 8. Usando las definiciones Kabat y AbM, se identificaron las tres CDR de cadena ligera y cadena pesada (Figuras 8 y 9). Una búsqueda en la base de datos NCBI IgBlast indica que la región variable de cadena ligera del anticuerpo muMy9-6 deriva lo más probablemente del gen de la línea germinal de ratón IgV $\lambda$  8-27 mientras la región variable de cadena pesada deriva lo más probablemente del gen de la línea germinal IgV $\mu$  102 (Figura 10).

### 3.7 Determinación de los residuos de superficie de la región variable del anticuerpo My9-6

Las técnicas de modificación de superficie de anticuerpos descritas por Pedersen et al. (1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-973) y Roguska et al. (1996, *Protein Eng.* 9:895-904) empiezan prediciendo los residuos de superficie de las secuencias variables de anticuerpo murino. Un residuo de superficie se define como un aminoácido que tiene al menos 30 % de su área superficial total accesible a una molécula de agua. En ausencia de una estructura resuelta para encontrar los residuos de superficie para muMy9-6, se alinearon los diez anticuerpos con las secuencias más homólogas en el conjunto de 127 archivos de estructura de anticuerpo (Figura 11A y B). La accesibilidad al disolvente para cada posición Kabat se promedió para estas secuencias alineadas y la distribución de las accesibilidades relativas para cada residuo se presenta en la Figura 12.

Varias posiciones de superficie tenían accesibilidades medias de entre 25 % y 35 %. Éstas se observaron más de cerca promediando sólo los anticuerpos con dos residuos idénticos flanqueando en cada lado (Figuras 13A y B). Los

25 residuos de superficie predichos para la cadena pesada de muMy9-6 no estaban cambiados después del análisis adicional, pero las posiciones Kabat 15 y 70 en la cadena ligera requirieron una consideración adicional. La alanina en la posición de cadena ligera 15 tenía una accesibilidad media de 34,4 % en las diez estructuras, pero sólo una única estructura, 1mcp, tenía residuos flanqueantes idénticos a los de muMy9-6. En esta estructura, Ala15 tenía una accesibilidad relativa de sólo 18,2 %. Como en esta única estructura Ala15 era dramáticamente menos accesible que el residuo promedio para la posición 15, las tres estructuras con sólo una única diferencia en los residuos flanqueantes (1ap2, 1frg, y 1hil) también se promediaron conjuntamente. La accesibilidad media para estas tres estructuras fue de nuevo 33,3 %, haciendo que Ala15 sea un residuo de superficie predicho. Finalmente, el anti-B4, C242, modificado en superficie, y la patente de modificación en superficie en sí misma predicen que la posición 15 de cadena ligera es un residuo de superficie. Tomados conjuntamente, la estrategia conservadora es asumir que la posición 15 de cadena ligera de muMy9-6 es un residuo de superficie.

La posición 70 de cadena ligera de muMy9-6 también requirió consideraciones especiales que finalmente resultaron en una predicción conservadora de que es un residuo de superficie. El trabajo de predicción inicial de superficie para la cadena ligera se hizo con datos MC sólo de las cinco estructuras de cadena ligera más homólogas y en este grupo Asp70 fue un residuo de superficie predicho. Posteriormente, con las cinco estructuras más homólogas adicionales, se encontró que la posición 70 tiene una accesibilidad media de 29,1 % como se muestra en la Figura 13A. Además, nueve de las diez estructuras tenían los residuos flanqueantes idénticos y el promedio de este conjunto fue 29,2 % accesible. Como este residuo parecía estar tan cercano al punto de corte de 30 % y la patente de modificación de superficie denomina la posición 70 una posición de superficie, los datos de accesibilidad se escrutaron adicionalmente. La posición 70 para la estructura 1lve tiene una accesibilidad relativa de 22,5 % que es cinco puntos de porcentaje menor que la siguiente accesibilidad más baja de 27,2 %. Como 1lve es la octava estructura más homóloga y era un valor atípico bajo, se tomó un promedio para las ocho estructuras con residuos flanqueantes idénticos además de 1lve y este conjunto tenía una accesibilidad media de 30,1 %. Esto, junto con el hecho de que el análisis inicial de cadena ligera de muMy9-6 y la patente de modificación de superficie denomina la posición 70 de cadena ligera una posición de superficie, dio lugar a la predicción conservadora de que Asp70 de cadena ligera de muMy9-6 es un residuo de superficie.

### 3.8. Modelado molecular para determinar qué residuos se encuentran en 5 Å de una CDR

El modelo molecular, generado con el paquete de software AbM, se analizó para determinar qué residuos de superficie de muMy9-6 se encuentran en 5 Å de una CDR. Con el fin de modificar la superficie del anticuerpo, todos los residuos de superficie fuera de una CDR deben cambiarse a su equivalente humano, pero los residuos que se encuentran en 5 Å de una CDR también pueden contribuir a la unión y especificidad del antígeno. Por lo tanto, estos residuos 5 Å deben identificarse y considerarse a lo largo del proceso de humanización. Las definiciones de CDR usadas para la modificación de superficie combinan la definición AbM para CDR2 de cadena pesada y las definiciones Kabat para las cinco CDR restantes (Figura 9). El modelo murino se analizó con el Software Swiss Viewer y la Figura 14 muestra los residuos que están en 5 Å de cualquier residuo CDR en la secuencia de cadena ligera o pesada.

### 3.9. Selección de la superficie humana más homóloga

Las superficies de anticuerpo humano candidatas para modificar la superficie de muMy9-6 se extrajeron de la base de datos de secuencia de anticuerpos Kabat usando software SR. Este software proporciona una interface para buscar sólo posiciones especificadas de residuos frente a la base de datos de anticuerpos. Para conservar las parejas naturales, los residuos de superficie tanto de las cadenas ligera como pesada se compararon entre sí. Las superficies humanas más homólogas de la base de datos Kabat se alinearon con el fin de clasificar la identidad de secuencia. Las cinco superficies mejores según se alinea por el software SR de la base de datos Kabat se proporcionan en la Figura 15. Las superficies se compararon para identificar qué superficies humanas requerirían menos cambios en 5 Å de una CDR. El anticuerpo anti-Virus de la Hepatitis C, LC3bPB (Ivanovski M. et al., 1998, *Blood* 91(7):2433-42), requiere el menor número de cambios de residuos de superficie (10 en total) y sólo cuatro de estos residuos se encuentran en 5 Å de una CDR. La secuencia de la región variable de longitud completa para muMy9-6 también se alineó frente a la base de datos de anticuerpos humanos Kabat con SR y LC3bPB se identificó como la 14ª secuencia de región variable humana más similar (datos no mostrados). Como el anticuerpo LC3bPB proporciona la superficie más homóloga y requiere el menor número de cambios en residuos 5 Å, es el mejor candidato para modificar la superficie de muMy9-6.

### 3.10. Construcción de los genes My9-6 para los anticuerpos My9-6 humanizados

Los diez cambios en residuos de superficie para huMy9-6 se hicieron usando técnicas de mutagénesis por PCR como se ha descrito anteriormente. Como seis de los residuos de superficie para LC3bPB estaban a más de 5 Å de una CDR, estos residuos se cambiaron de murino a humano en todas las versiones para My9-6 humanizado (Figuras 16A y B). Los cuatro residuos de superficie que sí se encontraban en 5 Å de una CDR, posiciones de cadena ligera Kabat 1, 3 y 45 y la posición de cadena pesada 64, bien se cambiaron a humano o se retuvieron como murino para preparar las 16 versiones humanizadas de My9-6. De éstas, la más humana es la versión 1.0 ya que tiene los diez residuos de superficie humana. La versión más conservadora en términos de asegurar la máxima afinidad de unión es la versión 1.1 que retiene los cuatro residuos de superficie murinos que están en 5 Å de una

CDR. Cada uno de los genes de anticuerpo My9-6 humanizado se clonaron en el plásmido de expresión de anticuerpo (Figura 5) para transfecciones temporales y estables.

### 3.11. Datos de unión

5 La fuerza clave de la humanización por modificación de superficie es que reteniendo los residuos marco murinos que no son de superficie, My9-6 humanizado debe continuar uniéndose a CD33 con afinidad inalterada. Sin embargo, los cuatro residuos de superficie que se encuentran en 5 Å de una CDR pueden contribuir a la unión al antígeno y, por lo tanto, el cambio de estos residuos podría tener un efecto negativo en la unión. Para abordar este problema, las 16 versiones de My9-6 humanizado incluyen todas las combinaciones de residuos bien humanos o murinos en cada una de las cuatro posiciones de residuos 5 Å. Estas varían de la versión óptima o más humana, 1.0, con residuos humanos en cada posición de superficie que no es CDR, a la versión más conservadora, 1.1, que retiene los residuos murinos en cada una de las cuatro posiciones de superficie 5 Å y, por lo tanto, debería retener la unión de tipo salvaje. Comparando la afinidad de unión de las versiones de My9-6 humanizado con My9-6 murino, la versión más humana que retiene la unión de tipo salvaje puede seleccionarse como el My9-6 modificado en superficie, humanizado.

15 Se hicieron experimentos de unión directa y competitiva con las versiones humanizadas de My9-6 murino y con muMy9-6 en la línea celular leucémica humana que expresa CD33, HL-60. Las tres versiones más humanas (V1.0, V1.3, V1.6) así como la versión más conservadora (V1.1) se ensayaron bien en membranas de HL-60 o células completas. La Figura 17 proporciona los valores KD para cada condición y la Figura 18 muestra curvas de unión ejemplo para huMy9-6, V1.0, frente a muMy9-6. Los valores KD calculados para las versiones humanizadas de My9-6 incluyendo la más humana, versión 1.0, es encuentran en el error experimental del valor KD de My9-6 murino. Los resultados de unión competitiva también demuestran que los anticuerpos huMy9-6 pueden competir igual de bien para la unión a CD33 que muMy9-6 en sí mismo. Con estos datos demostrando afinidades de unión cerca del tipo salvaje para el My9-6 completamente humanizado, V1.0, en membranas HL-60 y células completas, no hubo necesidad de ensayar versiones adicionales, ya que la versión 1.0 es el anticuerpo My9-6 humanizado óptimo.

25 El anticuerpo My9-6 murino se ha humanizado completamente sin pérdida de actividad de unión. Ninguno de los cambios de residuos de superficie de ratón a humano resultó en una pérdida de afinidad de unión, aún cuando cuatro de estos residuos de superficie estaban en 5 Å de una CDR. Se piensa que los residuos en 5 Å de una CDR hacen contactos de van der Waal potencialmente críticos que pueden afectar la estructura de estas CDR.

30 Los resultados de la humanización de My9-6 sugieren que al crecer los números de anticuerpos modificados en superficie, un análisis de posición de los residuos exhaustivo basado en datos de unión reales podría ser una forma más efectiva de tomar como diana residuos cuestionables en lugar de observar simplemente cualquier residuo en 5 Å de una CDR.

35 My9-6 V1.0 humanizado (huMy9-6) es el cuarto anticuerpo que se ha humanizado usando el procedimiento descrito en la presente memoria. La humanización por modificación de superficie del marco de región variable de un anticuerpo murino se desarrolló como una mejora sobre los métodos estándar de humanización, incluyendo injerto de CDR, que pueden requerir un desarrollo extenso y reingeniería para mantener la actividad de unión. Esto contrasta con el anticuerpo huMy9-6 modificado en superficie, que implicó cambiar sólo diez residuos de superficie para crear un anticuerpo completamente activo con una superficie completamente humana.

#### Ejemplo 4. Inmunoconjugado My9-6-DM1

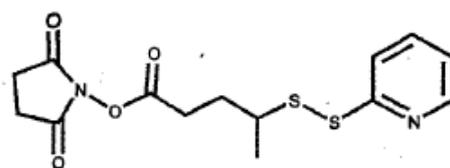
40 Se llevaron a cabo estudios pre-clínicos de eficacia con xenoinjertos de tumor humano en ratones usando el anticuerpo My9-6 conjugado con el fármaco maitansinoide DM1.

45 Como se discute más adelante, My9-6-DM1 mantuvo la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo no modificado para CD33, y mostró una citotoxicidad potente específica de antígeno frente a células tumorales positivas para CD33 *in vitro*. El tratamiento de ratones SCID que portan xenoinjertos de tumor HL-60 subcutáneos establecidos con My9-6-DM1, resultó en la erradicación completa de los tumores a dosis (20 mg de anticuerpo conjugado/kg/día i.v. x 5 días) que no mostraron toxicidad y que estaban muy por debajo de la máxima dosis tolerada. Por el contrario, el tratamiento con el anticuerpo My9-6 solo no tuvo efecto en el crecimiento del tumor HL-60 comparado con el control de vehículo. Se observó una eficacia curativa similar con My9-6-DM1 después de tratamiento de ratones que portan xenoinjertos THP-1 subcutáneos.

#### 50 4.1. Reactivos

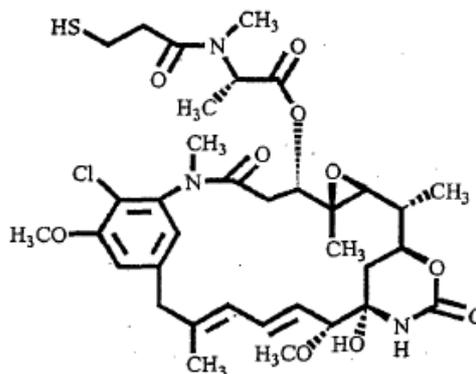
El anticuerpo fue el anticuerpo murino monoclonal My9-6 dirigido frente a CD33 humano descrito anteriormente.

El agente modificador del anticuerpo fue 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP):



SPP

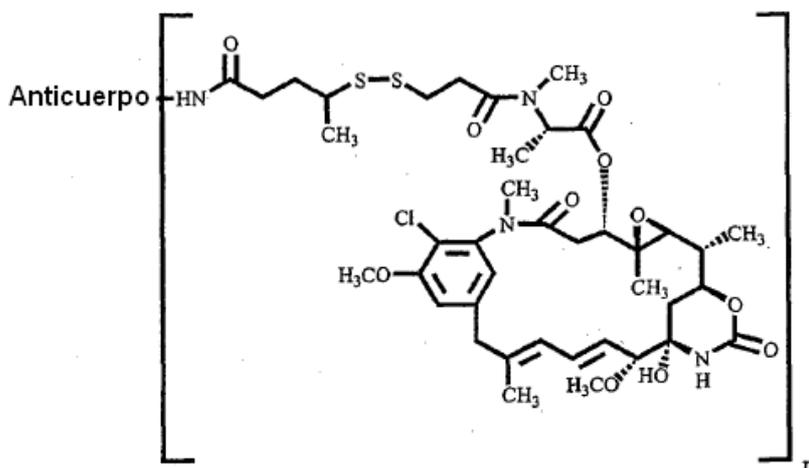
El fármaco citotóxico fue el análogo de maitansina DM1, que se sintetiza a partir de un producto de fermentación microbiano, Ansamitocina P3. DM1 es un inhibidor potente de la polimerización de la tubulina.



DM1

#### 5 4.2. Preparación de My9-6-DM1

My9-6-DM1 se preparó modificando el anticuerpo My9-6 con SPP para introducir 3-5 grupos piridilditio por molécula de anticuerpo. El intercambio de disulfuro entre el sustituyente tiol en el DM1 y la funcionalidad disulfuro activa en el anticuerpo proporcionó el conjugado de anticuerpo que contiene DM1.



10 (n puede ser cualquier número entero)

#### 4.3. Análisis de la unión del anticuerpo y conjugado de anticuerpo por citometría de flujo

15 Las células HL-60 se incubaron con varias concentraciones bien de anticuerpo My9-6 o My9-6-DM1. Las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG murino marcado con FITC. Después de un lavado adicional, las células se fijaron con 2 % formaldehído y la fluorescencia asociada a células se cuantificó usando un citómetro de flujo BD FACScan. My9-6-DM1 mantiene una unión específica a CD33 comparable con el anticuerpo no modificado (Figura 19).

#### 4.4. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad de My9-6-DM1 se midió usando la célula THP-1 que expresa CD33 y la línea celular negativa para CD33 Namalwa. Las células se plaquearon en placas de 96 pocillos en medio que contenía el conjugado y se incubó

a 37°C hasta que se formaron colonias (2-3 semanas). Las colonias se evaluaron, y las fracciones supervivientes se determinaron usando la distribución de Poisson en los cálculos.

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

5 Modelo de tumor subcutáneo- Se inocularon subcutáneamente células de leucemia promielocítica humana HL-60 ( $5 \times 10^6$  células en 0,1 mL) en el flanco derecho de ratones hembra SCID. Los ratones se trataron por inyección intravenosa en una vena lateral de la cola empezando cuando los tumores alcanzaron un tamaño de  $100 \text{ mm}^3$  ( $400 \text{ mm}^3$  en el modelo de tumor grande), El tamaño tumoral y el peso corporal de los ratones se midieron dos veces a la semana. Modelo de supervivencia - Se inyectaron intravenosamente células HL-60 ( $5 \times 10^6$  células en 0,1 mL) en la vena lateral de la cola de ratones hembra SCID. Once días después de la inyección de células tumorales empezó el tratamiento. Los ratones se evaluaron cada día para moribundos, masa tumoral, o muerte. El peso corporal se midió dos veces a la semana.

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

15 La citotoxicidad de My9-6-DM1 frente a células que expresan CD33 (THP-1) comparada con una línea celular negativa para CD33 (Namalwa) se ensayó usando un ensayo clonogénico, en el que la actividad de muerte celular se determina cuantificando el número de colonias que pueden crecer después del tratamiento. My9-6-DM1 presenta una potente actividad de muerte celular frente a células de tumor humano positivas para CD33 (Figura 20). No se observó toxicidad significativa frente a células negativas para CD33, indicando que la citotoxicidad dependiente de CD33 se debía a un direccionamiento específico del anticuerpo anti-CD33, My9-6.

#### 4.7. Eficacia de My9-6-DM1 frente a xenoinjertos de tumor humano en ratones

20 La eficacia de My9-6-DM1 *in vivo* se determinó usando ratones SCID que portan xenoinjertos de células tumorales HL-60 humanas. Las células HL-60 se inyectaron subcutáneamente y se dejó que los tumores crecieran hasta un tamaño medio de  $100 \text{ mm}^3$ . El conjugado My9-6-DM1 se administró i.v. una vez al día durante 5 días a las dosis indicadas en la Figura 21. La dosificación se expresa como mg de anticuerpo en el conjugado, que corresponde a una dosis de DM1 de aproximadamente  $15 \mu\text{g}$  de DM1 por mg de anticuerpo. El volumen tumoral se midió como una indicación de la eficacia del tratamiento y el peso corporal de los ratones se monitorizó para indicar toxicidad debida al tratamiento. My9-6-DM1 induce curas a largo plazo de ratones que portan xenoinjertos de células HL-60 humanas a dosis que causan poca toxicidad (Figura 21). A las dos dosis más altas ensayadas (19 y 26 mg/kg), se observó una regresión completa de los tumores con una pérdida máxima de peso corporal de menos del 10 % (Figuras 21A y B). Incluso a la dosis más baja ensayada (13 mg/kg), 2 de 5 ratones mostraron curas completas, mientras los otros 3 ratones mostraron regresión tumoral con un retraso en el crecimiento tumoral de aproximadamente 20 días. También se observaron resultados similares usando la línea celular leucémica THP-1 en la que My9-6-DM1 indujo curas a largo plazo de ratones que portan xenoinjertos de tumor THP-1 humano (datos no mostrados).

Estos resultados son profundamente contrarios a los obtenidos por tratamiento con anticuerpo My9-6 solo. El anticuerpo solo no tiene efecto en el crecimiento de las células tumorales incluso a 50 mg/kg (Figura 21C).

35 La actividad de My9-6-DM1 se comparó con el conjugado aprobado anticuerpo anti-CD33-caliqueamicina, Gemtuzumab ozogamicina. Gemtuzumab ozogamicina se administró cada 4 días para 3 dosis. Un experimento preliminar demostró que Gemtuzumab ozogamicina a la MTD publicada para ratones desnudos (0,3 mg/kg) fue demasiado tóxico para ratones SCID (datos no mostrados). También se observó una toxicidad significativa a la dosis de 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en este experimento (Figura 21F). Gemtuzumab ozogamicina sólo mostró una regresión tumoral y retraso del crecimiento modesto en este modelo (aproximadamente 25 días) a la máxima dosis tolerada (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Figura 21E).

45 En un experimento separado, la actividad anti-tumoral del conjugado My9-6-DM1 se comparó con la actividad del fármaco parental no conjugado, maitansina. Se trataron ratones que portan xenoinjertos de tumor HL-60 diariamente durante 5 días con el conjugado a 23 mg de anticuerpo/kg ó 350  $\mu\text{g}$  DM1/kg; fármaco no conjugado a 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; o anticuerpo no conjugado a 23 mg/kg. Tres de 6 ratones tratados con maitansina solo murieron dos días después del tratamiento indicando que este nivel de fármaco es bastante tóxico. Sin embargo, el fármaco mostró un impacto significativo en el crecimiento tumoral en los 3 ratones restantes, con un retraso en el crecimiento de aproximadamente 10 días (Figura 22).

50 El anticuerpo My9-6 solo no tuvo efecto en el crecimiento tumoral, mientras el conjugado My9-6-DM1 causó la regresión completa de los tumores. El efecto del tratamiento con conjugado en el peso corporal de los ratones (disminución del 12 %) fue ligeramente mayor que en el experimento previo y puede reflejar variaciones entre lotes en la síntesis del conjugado. Se observó recrecimiento de los tumores en dos de los seis ratones tratados con conjugado empezando en el día 70. Estos animales se sometieron a un segundo tratamiento de My9-6-DM1 idéntico al primer tratamiento. El segundo tratamiento resultó en la regresión completa de los tumores "de recaída" sin observarse toxicidad adversa, sugiriendo que el recrecimiento del tumor no era debido al crecimiento de células resistentes al conjugado.

55

La potente eficacia de My9-6-DM1 en este modelo de xenoinjerto sugirió que el conjugado puede ser efectivo incluso frente a tumores HL-60 grandes. Se dejó que los tumores crecieran hasta un volumen tumoral de  $> 400 \text{ mm}^3$  antes del inicio del tratamiento. Además, se llevó a cabo una comparación de la actividad de My9-6-DM1 con fármacos quimioterapéuticos estándar. My9-6-DM1 causó la regresión completa de tumores grandes en ratones SCID (Figuras 23A y B). De nuevo, los tumores de recaída (2 de 6 ratones) fueron sensibles a un segundo tratamiento de My9-6-DM1. El tratamiento con agentes quimioterapéuticos estándar (Ara-C e idarrubicina) tuvo un efecto pequeño en el crecimiento tumoral. Las dosis mayores de fármaco fueron profundamente tóxicas para los ratones (no mostrado).

#### 4.8. Eficacia de My9-6-DM1 en un modelo de supervivencia de ratones con células HL-60

Aunque la eficacia de My9-6-DM1 en el modelo de xenoinjerto tumoral es sorprendente, también es interesante observar la actividad del conjugado en un modelo de supervivencia de ratón en el que las células HL-60 se inyectan directamente en una vena de la cola del ratón. En este modelo, los ratones control murieron entre 30 y 50 días después de la inyección de células. Los ratones tratados con My9-6-DM1 empezando 11 días después de la inyección de células mostraron un incremento dramático en la supervivencia, con 7 de 8 ratones vivos a los 70 días (Figura 24A). La maitansina sola también mostró un impacto significativo en la supervivencia de los ratones en este modelo, aunque 2 de 8 ratones murieron poco después del inicio del tratamiento indicando toxicidad del fármaco. La eficacia relativa de la maitansina en este modelo comparada con el modelo de xenoinjerto subcutáneo sugiere que los tumores HL-60 pueden ser más sensibles a la acción del fármaco en este entorno. Un retraso adicional en el inicio del tratamiento puede demostrar una diferencia más aguda entre el fármaco dirigido y no dirigido. Sin embargo, incluso en este modelo, la quimioterapia estándar no proporcionó un aumento significativo de la supervivencia (Figura 24B). La dosis más alta de combinación mostró una toxicidad aparente del fármaco significativa. Tanto el anticuerpo My9-6 solo como Gemtuzumab ozogamicina mostraron un incremento modesto en la supervivencia.

#### Declaración de depósito

El hibridoma que produce anticuerpos My9-6 murinos se depositó en la American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA 20108, el 7 de noviembre, 2002, bajo los Términos del Tratado de Budapest y se le asignó el número de depósito PTA-4786.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ImmunoGen, Inc.

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD33 Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA USANDO LOS MISMOS

<130> F174222

<150> US 60/424,332

<151> 2002-11-07

<160> 94

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Ser Tyr Tyr Ile His  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (16)..(16)

<223> "X" puede ser K o Q

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 4

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

<400> 4

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

Ala

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

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr



ES 2 539 627 T3

<223> Región variable de cadena pesada del anticuerpo My9-6 humanizado

<400> 9

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

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

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

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera del anticuerpo My9-6 humanizado

<400> 10

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser  
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln  
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln  
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 11

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR HindKL

<400> 11

tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc

46

<210> 12

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR Bgl2IcG1

<400> 12

ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt ttggc

36

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR EcoPolydC

<400> 13

tatatctaga attccccccc ccccccccc

30

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR SacI1MK

<400> 14  
gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca

32

<210> 15  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de PCR EcoR1MH1

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (18) .. (18)  
<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<400> 15  
cttcgggaat tcsargtnma gctgsagsag tc

32

<210> 16  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de PCR EcoR1MH2

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (18) .. (18)  
<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<400> 16  
cttcgggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg

35

<210> 17  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador degenerado Leaddeg1

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (26) .. (26)  
<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (29) .. (29)  
<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<400> 17  
 ttttgattct gctgtgggtg tccggnact gygg

34

<210> 18  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador degenerado Le'addeg2

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (28) .. (28)  
 <223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (31) .. (31)  
 <223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<400> 18  
 ttttgattcg ctgctgctgc tgtgggnws ngg

33

<210> 19  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador degenerado Le'addeg3

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (31) .. (31)  
 <223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (34) .. (34)  
 <223> "n" puede ser cualquier nucleótido

<400> 19  
 ttttgattcc caggtgttca tgctgctgyt nytntgggt

39

<210> 20  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización My96LCBsrG1

<400> 20

tacaggtgta cactccgata ttgtgatcac ccagactcc 39

<210> 21  
 <211> 35  
 <212> **ADN**  
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>  
 <223> **Cebador de humanización My96LCOL1**

<400> 21  
 actggaaatc aaacgaactg tggetgcacc atctg 35

<210> 22  
 <211> 35  
 <212> **ADN**  
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>  
 <223> **Cebador de humanización My96LCOL2**

<400> 22  
 gccacagttc gtttgatttc cagtttggtg cctcc 35

<210> 23  
 <211> 39  
 <212> **ADN**  
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>  
 <223> **Cebador de humanización My96HCBsrG1**

<400> 23  
 tacaggtgta cactcccagg ttaagctgca gcagctctgg. 39

<210> 24  
 <211> 29  
 <212> **ADN**  
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>  
 <223> **Cebador de humanización My96HCOL1**

<400> 24  
 ccacggtcac cgtctcctca gcctccacc 29

<210> 25  
 <211> 29  
 <212> **ADN**  
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>  
 <223> **Cebador de humanización My96HCOL2**

<400> 25

gaggctgagg agacggtgac cgtggtccc	29
<210> 26	
<211> 43	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador de humanización My9-6LCNMLS	
<400> 26	
caggtgtaca ctccaatatt atgctcacc c agagtccatc atc	43
<210> 27	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador de humanización My9-6HCQP	
<400> 27	
caggtgtaca ctcccaggtt cagctgcagc agcctggggc tg	42
<210> 28	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador de humanización MY96HCQ64-1	
<400> 28	
agaagttcca aggcaaggcc ac	22
<210> 29	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador de humanización MY96HCQ64-2	
<400> 29	
cttgccttgg aacttctgat tg	22
<210> 30	
<211> 60	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador de humanización MY96HCQ105	
<400> 30	

cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgaccgtg gtcocctggc cccagacatc 60

<210> 31  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización MY96LCEVGPR

<400> 31  
 aggtgtacac tccgagattg tgctcaccca gagtccagga tctctggctg tgtctccagg 60  
 agaaagggtc actatgagc 79

<210> 32  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización MY96LCR45

<400> 32  
 gcctgggtacc aacagatacc agggcagtct cctagacttc tgatctac 48

<210> 33  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización MY96LCP80-1

<400> 33  
 agcagtgttc aacctgaaga cctggc 26

<210> 34  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización MY96LCP80-2

<400> 34  
 gtcttcaggt tgaacactgc tgatgg 26

<210> 35  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización MY96LCQ100

<400> 35  
 ttttaagctt cgtttgattt ccagtttggg gccttgaccg aacgtccg 48

<210> 36  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización My96lcNM

<400> 36  
 caggtgtaca ctccaatatt atgctcaccc agag 34

<210> 37  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización MY96LCK45

<400> 37  
 gccttggtacc aacagatacc agggcagtct cctaaacttc tgatctac 48

<210> 38  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización My96HCApa1

<400> 38  
 cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgaccg 38

<210> 39  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización huMy96LCOL1

<400> 39  
 actggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctg 35

<210> 40  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de humanización huMy96LCOL2

<400> 40  
gccaccgtac gtttgatttc cagtttggtg ccttg 35

<210> 41  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de humanización My96lcEM My96lcNV chMy96lcBsiW1

<400> 41  
caggtgtaca ctccgagatt atgctcacc c agag 34

<210> 42  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de humanización My96lcNV

<400> 42  
caggtgtaca ctccaatatt gtgctcacc agag 34

<210> 43  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de humanización chMy96lcBsiW1

<400> 43  
ttttcgtaag tttgatttcc agtttggtgc c 31

<210> 44  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (23) .. (23)  
<223> "X" puede ser cualquier aminoácido

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Xaa  
20

<210> 45  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 45

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys  
 20

<210> 46  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador degenerado Sac1MK

<400> 46

Gly Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Gly Thr  
 1 5 10 15

Gly Met Thr Ser Ala Cys Met Cys Ala Arg Trp Cys Thr Met Cys Ala  
 20 25 30

<210> 47  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 47

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys  
 20

<210> 48  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 48

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

Ala

<210> 49  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 49

Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys  
 1                   5                   10

<210> 50  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 50

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1                   5                   10

<210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 51

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu  
 1                   5                   10

<210> 52  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 52

Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10                   15

Ala Lys Thr

<210> 53  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 53



ES 2 539 627 T3

<210> 57  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 57.

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

Gly

<210> 58  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His  
 1 5 10

<210> 59  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 59

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser  
 1 5 10

<210> 60  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 60

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

ES 2 539 627 T3

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln  
85 90 95

Tyr Leu Ser

<210> 61  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 61

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

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

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

Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
50 55 60

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

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

<210> 62  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 62

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser  
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

ES 2 539 627 T3

35 40 45  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln  
 85 90 95  
 Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Ala

<210> 63  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 63

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

Lys Arg Ala  
 115

ES 2 539 627 T3

<210> 64  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 64

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
 20 25 30

Gly Lys Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110

Lys Arg Ala  
 115

<210> 65  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 65

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

Gly Ala Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

ES 2 539 627 T3

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser  
 65 70 75 80

Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95

Asn Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110

Lys Arg Ala  
 115

<210> 66  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 66

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

Arg Thr Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser  
 65 70 75 80

Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95

Asn Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110

Lys Arg Ala  
 115

<210> 67

ES 2 539 627 T3

<211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 67

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
 20 25 30

Gly Lys Arg Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Ser His Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110

Lys Arg Ala  
 115

<210> 68  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 68

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

ES 2 539 627 T3

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Ala  
115

<210> 69  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 69

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ile  
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Gln Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln  
85 90 95

His Tyr Arg Ala Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 70  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

ES 2 539 627 T3

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg

<210> 71

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

ES 2 539 627 T3

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95

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

Gly

<210> 72  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 72

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala  
 100 105

<210> 73  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 73

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

ES 2 539 627 T3

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

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

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser  
 115

<210> 74  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 74

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 50

ES 2 539 627 T3

100 105 110

Val Thr Val Ser  
115

<210> 75  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 75

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

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

Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
115

<210> 76  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 76

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

ES 2 539 627 T3

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser  
 115

<210> 77

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

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

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

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

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys  
 50 55 60

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Asn Ile  
 65 70 75 80

His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95

Arg Glu Gly Glu Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

Ser

<210> 78  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1)..(1)  
 <223> "X" puede ser cualquier aminoácido

<400> 78

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110

Ser

<210> 79  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 79

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

ES 2 539 627 T3

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
 20 25 30

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

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

Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser  
 115

<210> 80  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 80

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

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met  
 20 25 30

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

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

Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 65 70 75 80

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

Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100

105

110

Val Ser

<210> 81  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 81

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser  
 115

<210> 82  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 82

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

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

ES 2 539 627 T3

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 115

- <210> 83
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 83

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Phe Asp  
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 115 120

<210> 84  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 84

Asn Met Thr Ser Ala Lys Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Asp Ser Glu  
 1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg Ala  
 20

<210> 85  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 85

Asp Gln Thr Ser Val Arg Pro Gly Glu Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu  
 1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg Thr  
 20

<210> 86  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 86

Asp Val Thr Ser Val Arg Pro Gly Lys Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu  
 1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg  
 20

<210> 87  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 87

Asp Gln Thr Ser Val Arg Pro Gly Lys Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu  
 1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg Thr  
20

<210> 88  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 88

Glu Val Thr Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Asp Pro Glu  
1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg  
20

<210> 89  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 89

Asp Val Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ala Asp Ala Glu  
1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg  
20

<210> 90  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 90

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Lys  
1 5 10 15

Gly Lys Ser Ser Ser Glu Ala Ser  
20

<210> 91  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 91

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Gly Thr Pro Ser Ser Glu Lys Ser  
20

<210> 92  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 92

Gln Gln Ala Ala Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Ser Glu Gln Ser  
20

<210> 93  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 93

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Gly Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser  
20

<210> 94  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 94

Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly  
1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser  
20

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo específico de CD33, que comprende:

(i) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYMQ  
KFQGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

5 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(ii) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYMQ  
KFQGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

10 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**NIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(iii) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYMQ  
KFKGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

15 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(iv) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYMQ  
KFQGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

20 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**NIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(v) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

NIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR;

- 5 (vi) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR;

- 10 (vii) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR;

- 15 (viii) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

EIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR;

- 20 (ix) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**EIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(x) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

5 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**EIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(xi) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

10 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**EIMLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(xii) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNG  
KFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

15 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**NIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(xiii) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDI  
SYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

20 y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**NIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR;**

(xiv) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNQ  
KFQGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**NIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR; o**

5

(xv) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNQ  
KFKGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS;**

y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**NIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR.**

10

2. El anticuerpo específico de CD33 de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNQ  
KFQGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID  
NO: 9),**

y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por:

**EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESG  
VPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKR (SEQ ID NO: 10).**

15

3. Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2 unido a un fármaco o un profármaco.

4. El inmunocombinado de la reivindicación 3, en el que dichos fármaco o profármaco se seleccionan del grupo que consiste en un maitansinoide, un taxoide, CC-1065, un análogo de CC-1065, dolastatina, un análogo de dolastatina, metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, caliqueamicina y derivados de éstos.

20

5. Una composición que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2 y un fármaco o un profármaco.

6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2, o el inmunocombinado o la composición de las reivindicaciones 3-5, y un agente farmacéuticamente aceptable.

25

7. Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD33, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula con el anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2, el inmunocombinado de las reivindicaciones 3 ó 4, la composición de la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6.

8. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2, el inmunocombinado de las reivindicaciones 3 ó 4, la composición de la reivindicación 5 o la composición farmacéutica de la reivindicación 6 para uso como medicamento.

9. El uso del anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2, el inmunoconjugado de las reivindicaciones 3 ó 4, la composición de la reivindicación 5 o la composición farmacéutica de la reivindicación 6 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer.
- 5 10. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2, el inmunoconjugado de las reivindicaciones 3 ó 4, la composición de la reivindicación 5 o la composición farmacéutica de la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de cáncer.
11. El uso o el anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición o la composición farmacéutica para uso de las reivindicaciones 9 ó 10 en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia pro-mielocítica (PML).
12. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 10 13. Un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera y una pesada del anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 2.
14. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de las reivindicaciones 12 ó 13.
15. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de la reivindicación 14.
- 15 16. Un método para producir un anticuerpo específico de CD33, comprendiendo dicho método (a) cultivar una célula huésped según se reivindica en la reivindicación 15 en condiciones tales que dicha célula huésped expresa el anticuerpo, y (b) recoger el anticuerpo así expresado.

Figura 1

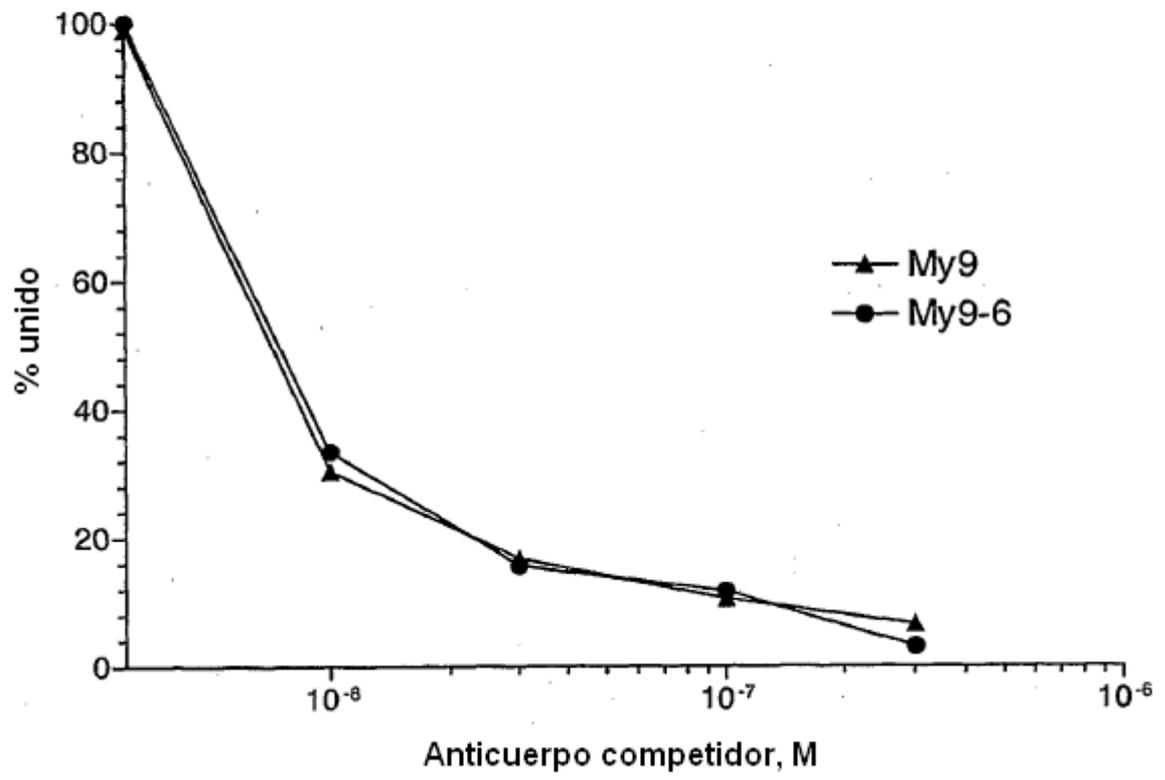


Figura 2

Cebadores Degenerados de Secuencia Señal de Cadena Ligera de My9-6

<u>Nombre</u>	<u>Secuencia</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
Leaddeg1	TTTTGATTCTGCTGTGGGTGTCCGGNACNTGYGG	17
Leaddeg2	TTTTGATTTCGCTGCTGCTGCTGTGGGTNWSNGG	18
Leaddeg3	TTTTGATTCCCAGGTGTTTCATGCTGCTGYTNYTNTGGGT	19

Bases mixtas: S = G+C, Y = C+T, W = A+T, N = A+T+G+C.

Figura 3

127 Archivos de Estructura Brookhaven Usados para Predicciones de Superficie									
2rcs	3hfl	3hfm	1aif	1a3r	1bbj	43c9	4fab	6fab	7fab
2gfb	2h1p	2hfl	1a6t	1axt	1bog	2hrp	2jel	2mcp	2pcp
1yuh	2bfv	2cgr	8fab	1ae6	1bvl	2dbl	2f19	2fb4	2fbj
1sm3	1tet	1vfa	glb2	1a4j	1cly	1vge	1yec	1yed	1yee
1nsn	1opg	1osp	1aj7	1ayl	1clz	1plg	1psk	1rmf	1sbs
1ncd	1nfd	1ngp	1acy	1afv	1cbv	1nid	1nma	1nmb	1nqb
1mcp	1mfb	1mim	15c8	1a5f	1axs	1mLb	1mpa	1nbv	1ncb
1jrh	1kb5	1kel	1ap2	1b2w	1adq	1kip	1kir	1lve	1mam
1igi	1igm	1igt	1ad0	1baf	1cfv	1igy	1ikf	1jel	1jhl
1gpo	1hil	1hyx	1a0q	1bjm	1clo	1iai	1ibg	1igc	1igf
1fpt	1frg	1fvc	1aqk	1bln	1d5b	1gaf	1ggi	1ghf	1gig
1fai	1fbi	1fdl	1ad9	1bbd	1f58	1fgv	1fig	1flr	1for
	1dbl	1dfb	1a3l	1bfo	1eap	1dsf	1dvf		

Figura 4

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
My96LCBsrGI	TACAGGTGTACACTCCGATATTTGTGATCACCCAGACTCC	20
My96LCOL1	ACTGGAAATCAAACGAACCTGTGGCTGCACCATCTG	21
My96LCOL2	GCCACAGTTCGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCCTCC	22
My96HCBsrGI	TACAGGTGTACACTCCAGGTTAAGCTGCAGCAGTCTGG	23
My96HCOL1	CCACGGTCAACCGTCTCTCCCTCAGCCTCCACC	24
My96HCOL2	GAGGCTGAGGAGACGGTGCACCGTGGTCCC	25
My9-6LCNM1S	CAGGTGTACACTCCAATATTTATGCTCACCCAGAGTCCATCATC	26
My9-6HCQP	CAGGTGTACACTCCAGGTTTCCAGTGCAGCAGCCTGGGGCTG	27
MY96HCQ64-1	AGAAGTTCCAAAGGCAAGGCCAC	28
MY96HCQ64-2	CTTGCCTTGGAACTTCTGATTTG	29
MY96HCQ105	CGATGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGTACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGACATC	30
MY96LCEVGPR	AGGTGTACACTCCGAGATTTGTGCTCACCCAGAGTCCAGGATCTCTGGCTGTGCTCCAGGAGAAAGGTCACATGAGC	31
MY96LCR45	GCCTGGTACCACACAGATACCAGGGCAGTCTCCTAGACTTCTGATCTAC	32
MY96LCP80-1	AGCAGTGTTCAAACCTGAAGACCTGGC	33
MY96LCP80-2	GTCTTCAGGTTGAACACTGCTGATGG	34
MY96LCQ100	TTTTAAGCTTCGTTTGTGATTTCCAGTTTGGTGGCCTTGACCCGAAACGTTCCG	35
My96lcNM	CAGGTGTACACTCCAATATTTATGCTCACCCAGAG	36
MY96LCK45	GCCTGGTACCACACAGATACCAGGGCAGTCTCCTAAACTTCTGATCTAC	37
My96HCAPA1	CGATGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGCACCG	38
huMy96LCOL1	ACTGGAAATCAAACCGTACGGTGGTGCACCCATCTG	39
huMy96LCOL2	GCCACCGTACCGTTTGTGATTTCCAGTTTGGTGGCCTTTG	40
My96lcEM	CAGGTGTACACTCCGAGATTTATGCTCACCCAGAG	41
My96lcNV	CAGGTGTACACTCCAATATTTGCTCACCCAGAG	42
chMy96lcBstW1	TTTTTCGTACGTTTGTGATTTCCAGTTTGGTGGC	43

Figura 5

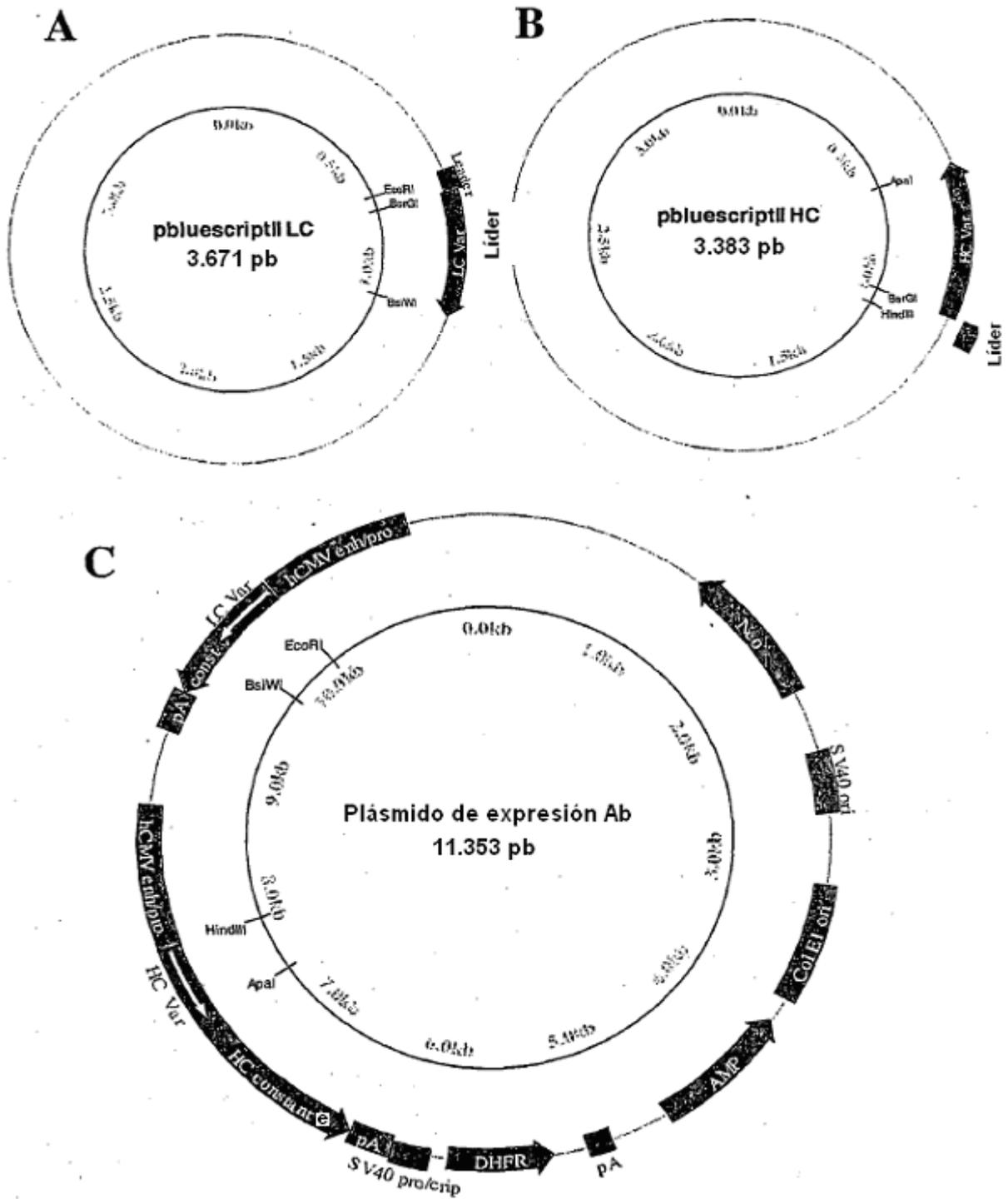


Figura 6A

Secuencia Peptidica Amino Terminal de Cadena Ligera de muMy9-6		SEQ ID NO:
Secuencia Edman	Kabat# N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M (S) X 5 10 15 20 23	44
ADNc Deg	D I V I T Q T P S S L A V S A G E K V T M S C	45
Cebador Sac1MK	E L D I V X T Q X X GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA	46
ADNc Deg Pep Señal	N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C	47

Figura 6B

Análisis de Secuencia MS-MS de Fragmentos Peptidicos de CDR de Cadena Ligera de muMy9-6		SEQ ID NO:
CDR1	K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A	48
1319 Da	S S Q S V F F S S S Q K	49
CDR2	K L L I Y W A S T R E S	50
1122 Da	K L L I Y W A S T R E	51

Figura 7

Secuencia Peptidica Interna/CDR3 de Cadena Pesada de muMy9-6		SEQ ID NO:
Secuencia 1.788 Da	(R) Y F D V W G A G T T V T V S S A K (T)	52
Clon 2 de ADNc (concordancia)	<u>E V R L R Y F D V</u> W G A G T T V T V S S CDR3	53
Clon 1 de ADNc (noconcordancia)	<u>M G E D A - M D Y</u> W G Q G T S V T V S S CDR3	54

Figura 8A

Cadena Ligera (numeración secuencial) (SEQ ID NO:55):

1 aacattatgctgacacagtcgccatcatctctggctgtgtctgca  
 1 N I M L T Q S P S S L A V S A

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

91 ttcagttcaagtcagaagaactacttggcctggtaccaacagata  
 31 F S S S Q K N Y L A W Y Q Q I  
 CDR1

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

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

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

271 atttattactgtcatcaatacctctcctcgcgagcgttcggtgga  
 91 I Y Y C H Q Y L S S R T F G G  
 CDR3

316 ggcaccaaactggaaatcaaacga  
 106 G T K L E I K R

Figura 8B

Cadena Pesada (numeración secuencial) (SEQ ID NO:56):

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

46 gcctcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacacatttacc  
 16 A S V K M S C K A S G Y T F T

91 agttactatatacactggataaagcagacacctggacagggcctg  
 31 S Y Y I H W I K Q T P G Q G L  
 CDR1

136 gaatggggttgagttatccaggaatgatgatatttcctac  
 46 E W V G V I Y P G N D D I S Y  
 CDR2

181 aatcagaagttcaaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcc  
 61 N O K F K G K A T L T A D K S  
 CDR2

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

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

316 gatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtctcctca  
 106 D V W G A G T T V T V S S

Figura 9

CDRs de My9-6 MurinoCadena LigeraSEQ ID NO:

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

4

CDR2: W A S T R E S

5

CDR3: H Q Y L S S R T

6

Cadena Pesada

CDR1: S Y Y I H

1

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

57

CDR3: E V R L R Y F D V

3

Cadena Pesada AbM

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

58

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

59

CDR3: E V R L R Y F D V

3

Figura 10

Comparaciones de Secuencia de Línea Germinal

<u>Cadena Ligera</u>		50
8-27*	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP	
muMy9-6	...L.....FF..S.....I.....	
		99
8-27	KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLS	
muMy9-6	.....S.....I.....	
<u>Cadena Pesada</u>		50
V102#	-VQLQQPGAELVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGR	
muMy9-6	Q.....V.....M.....YI..I..T.....V.V	
		98
V102	IHPSDSDTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA-	
muMy9-6	.Y.GND.IS.....A....T.....R	

\* SEQ ID NO:60  
# SEQ ID NO:61

Numeración de residuos secuencial

Figura 11A

Diez Secuencias de Cadena Ligera Más Homólogas con Estructuras

	1				50
My96	NIMLTQSPSS	LAVSAGEKVT	MSCKSSQSVF	FSSSQKNYLA	WYQQIPGQSP
1sbs	DIVMSQSPSS	LAVSVGEKVT	MTCKSSQSLI	YSSNQMNyla	WYQQKPGQSP
1hil	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCTSSQSLF	NSGKQKNYLT	WYQQKPGQPP
1a5f	DIVMTQSPSS	LTVTTGEKVT	MTCKSSQSLI	NSGAQKNYLT	WYQQKPGQSP
1a3r	DIVMTQSPSS	LTVTTGEKVT	MTCKSSQSLI	NSRTQKNYLT	WYQQKPGQSP
1frg	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCKSSQSLF	NSGKRKNFLT	WYHQKPGQPP
1mcp	DIVMTQSPSS	LSVSAGERVT	MSCKSSQSLI	NSGNQKNFLA	WYQQKPGQPP
43c9	DVVMQTQSPSS	LAMSVGQKVT	MSCKSSQSLI	NISNQKNYLA	WYQQKPGQSP
1lve	DIVMTQSPSS	LAVSLGERAT	INCKSSQSVL	YSSNSKNYLA	WYQQKPGQPP
1ap2	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCKSSQSLI	NSGNQKNYLT	WYQQKPGQPP
1ncb	DIVMTQSPKF	MSTSVGDRVT	ITCKASQDVS	T.....AVV	WYQQKPGQSP
					100
My96	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQSEDLA	IYYCHQYLSS
1sbs	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVEAEDLA	VYYCQYHSY
1hil	KVLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDYSN
1a5f	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLS	ISGVQAEDLA	VYYCQNNYNY
1a3r	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLS	ISGVQAEDLA	VYYCQNNYNY
1frg	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ITSVQAEDLA	IYYCQNDYSH
1mcp	KLLIYGASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDHSY
43c9	KLLVYFASTR	ESGVPDRFIG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDQA	DYFCQQHYRA
1lve	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQYYST
1ap2	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDYSY
1ncb	KLLIYWASTR	HIGVPDRFAG	SGSGTDYTLT	ISSVQAEDLA	LYYCQQHYSP
			115		
My96	.RTFGGGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:62)		
1sbs	PFTFGSGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:63)		
1hil	PLTFGGGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:64)		
1a5f	PLTFGAGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:65)		
1a3r	PLTFGAGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:66)		
1frg	PLTFGAGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:67)		
1mcp	PLTFGAGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:68)		
43c9	PRTFGGGTKL	EIK	(SEQ ID NO:69)		
1lve	PYSFGQGTKL	EIKR	(SEQ ID NO:70)		
1ap2	PLTFGAGTKL	EPG	(SEQ ID NO:71)		
1ncb	PWTFGGGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:72)		

La numeración de residuos es secuencial

Figura 11B

Diez Secuencias de Cadena Pesada Más Homólogas con Estructuras

	1				50
My96	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SCKASGYTFT	SYIHWIKQT	PGQGLEWVGV
1plg	QIQLQQSGPE	LVRPGASVKI	SCKASGYTFT	DYIHWVKQR	PGEGLEWIGW
1ae6	QIQLQQSGPE	LVKPGASVKI	SCKASGYTFT	DYYINWMKQK	PGQGLEWIGW
1for	QGQLQQSGAE	LVRPGSSVKI	SCKASGYAFS	SFWVNWVKQR	PGQGLEWIGQ
1igy	.VKLQESGAE	LARPGASVKM	SCKASGYTFT	TYTIHWIKQR	PGQGLEWIGY
1bbj	XVQLQQSDAE	LVKPGASVKI	SCKASGYTFT	DHAIHWAKQK	PEQGLEWIGY
1nqb	.VQLQQSGAE	LVKPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWMHWVKQR	PGRGLEWIGR
1mim	..QLQQSGTV	LARPGASVKM	SCKASGYSFT	RYWMHWIKQR	PGQGLEWIGA
1a6t	EVQLQQSGPD	LVKPGASVKI	SCKASGYSFS	TYMHWVKQS	HGKSLEWIGR
1d5b	QVQLQQSGAE	LMKPGASVKI	SCKATGYTFS	SFWIEWVKQR	PGHGLEWIGE
1fai	QVQLQQSGAE	LVRAGSSVKM	SCKASGYTFT	SYGVNWKQR	PGQGLEWIGY
					100
My96	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCAREV
1plg	IYPGSGNTKY	NEKFKGKATL	TVDTSSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYFCARGG
1ae6	IDPGSGNTKY	NEKFKGKATL	TVDTSSSTAY	MQLSSLTSED	TAVYFCAREK
1for	IYPGDGDNKY	NGKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLYSLTSED	SAVYFCARSG
1igy	INPSSVYTNV	NQRFKDKATL	TRDRSSNTAN	IHLSSLTSDD	SAVYYCVREG
1bbj	ISPGNDDIKY	NEKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLNSLTSED	SAVYFCRKS
1nqb	IDPNSGGTKY	NEKFKSKATL	TVDKPSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARYD
1mim	IYPGNSDTSY	NQKFEKGAKL	TAVTSASTAY	MELSSLTHED	SAVYYCSRDY
1a6t	VDPDNGGTSF	NQKFKGKAIL	TVDKSSSTAY	MELGSLTSED	SAVYYCARRD
1d5b	ILPGSGGTHY	NEKFKGKATF	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARGH
1fai	INPGKGYLSY	NEKFKGKTTL	TVDRSSSTAY	MQLRSLTSED	AAVYFCARSF
					124
My96	RLRY.....	FDVWGAGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:73)	
1plg	K.....FA	MDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:74)	
1ae6	TTY,...YA	MDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:75)	
1for	NYPY.....A	MDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:76)	
1igy	.....E	VPYWGQGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:77)	
1bbj	YGHW.....	....GQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:78)	
1nqb	YYGS....SY	FDYWGQGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:79)	
1mim	GYF.....	.DFWGQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:80)	
1a6t	DY.....Y	FDYWGQGTSL	TVSS	(SEQ ID NO:81)	
1d5b	SYFY....D	GDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:82)	
1fai	YGGSDLAVYY	FDSWGQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:83)	

La numeración de residuos es secuencial

Figura 12A

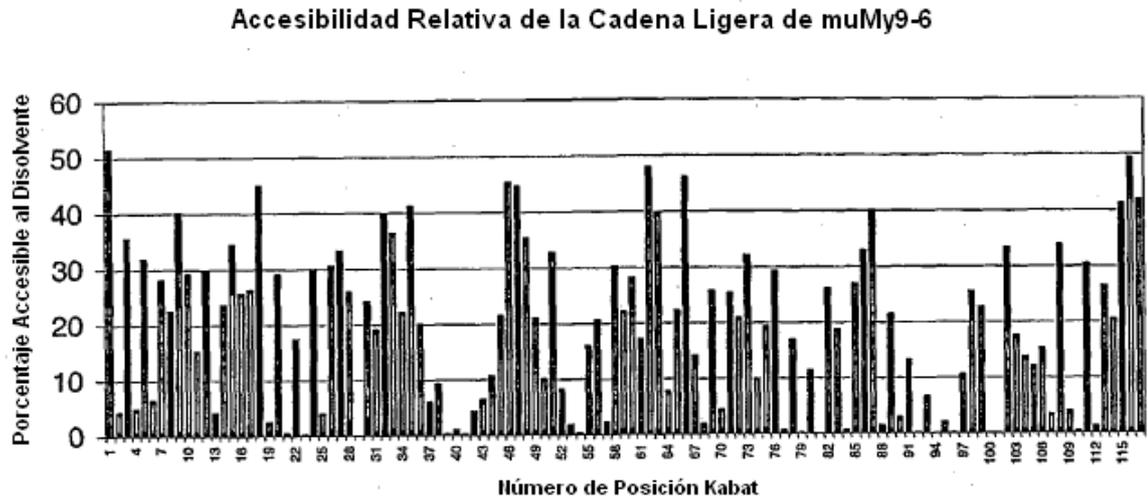


Figura 12B

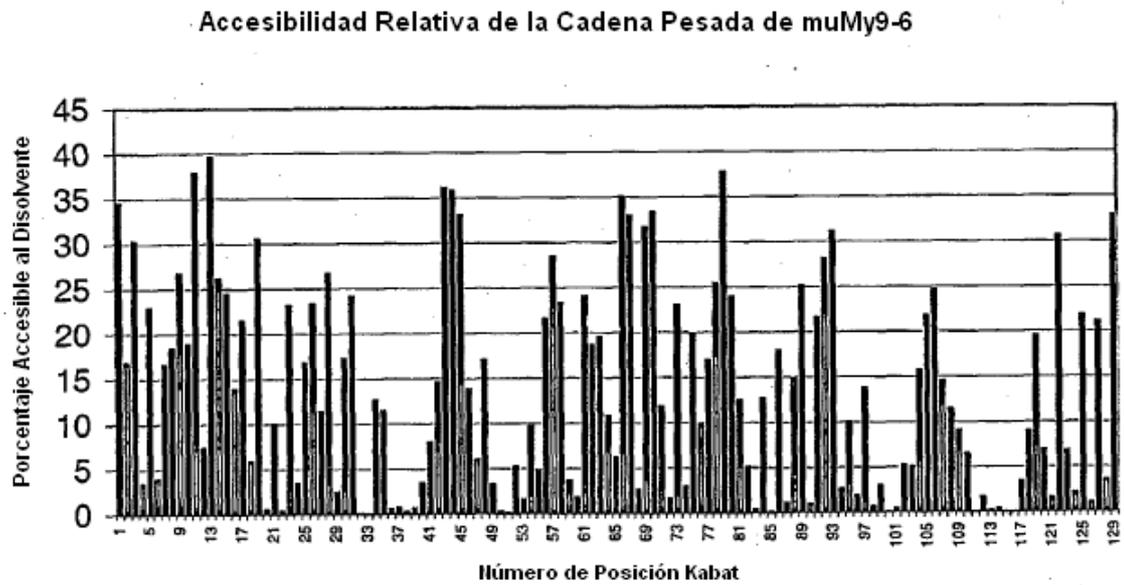


Figura 13A

Residuos de Superficie de la Cadena Ligera de muMy9-6						
Posición Kabat #	Accesibilidad media	>30% Acc media	25%-35% Acc media	Flanco idéntico		Superficie muMy9-6
1	51.46	1				N1
3	35.42	3				M3
5	31.82	5	5	NA		T5
7	28.04		7	26.17		
9	40.08	9				S9
10	29.04		10	27.76		
12	29.63		12	22.32	otros A's	
15	34.39	15	15	18.20	33.36	A15
16	25.61		16	NA		
17	26.21		17	25.11		
18	44.83	18				K18
20	28.91		20	29.11		
40	45.25	40				P40
41	44.52	41				G41
42	35.34	42				Q42
45	32.68	45	45	32.58		K45
57	39.81	57				G57
60	46.07	60				D60
63	25.60		63	26.87		
65	25.28		65	24.07		
67	32.05	67	67		Ilve excluido	S67
70	29.16		70	29.28	30.13	D70
76	26.02		76	24.29		
79	26.83		79	NA		
80	32.78	80	80	NA		S80
81	39.95	81				E81
100	33.79	100	100	34.05		G100
103	30.30	103	103	30.30		K103
105	26.42		105	26.96		
107	41.06	107				K107
108	49.29	108				R108
109	41.85	109				A109

Figura 13B

Residuos de Superficie de la Cadena Pesada de muMy9-6					
Posición Kabat #	Accesibilidad media	>30% Acc media	25%-35% Acc media	Flanco idéntico	Superficie muMy9-6
1	40.08	1			Q1
3	38.62	3			Q3
5	28.06		5	NA	
9	35.98	9			A9
11	48.07	11			V11
13	49.75	13			K13
14	32.39	14	14	32.20	P14
15	30.69	15	15	31.84	G15
17	26.01		17	26.67	
19	37.64	19			K19
23	29.92		23	30.11	K23
26	29.48		26	31.43	G26
28	33.67	28	28	35.59	T28
41	44.46	41			P41
42	46.28	42			G42
43	42.00	43			Q43
52B	25.21		52B	25.21	
53	28.84		53	28.84	
56	29.08		56	29.08	
61	43.12	61			Q61
62	44.46	62			K62
64	38.56	64			K64
65	41.85	65			G65
68	28.38		68	28.30	
70	25.14		70	28.21	
73	32.97	73	73	35.71	K73
74	47.68	74			S74
75	26.67		75	27.22	
82B	32.62	82B	82B	30.58	S82B
83	26.03		83	26.52	
84	35.34	84			S84
85	37.78	85			E85
105	36.29	105			A105
108	25.74		108	28.73	
110	26.94		110	23.38	
112	41.61	112			S112

Figura 14

Residuos de Superficie de muMy9-6 en 5 Å de un Residuo de CDR

Cadena ligera	Cadena pesada
N1	Q1
M3	T28
T5	K64
K45	K73
G57	
D60	
S67	
D70	

Figura 15

Anticuerpo	Las Cinco Superficies de Anticuerpo Humano Mas Homólogas		SEQ ID NO:
	Cadena Ligera	Cadena Pesada	
muMy9-6	N M T S A K P G Q K G D S D S E G K K R A	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K G K S S E A S	90
21H9	D Q T S V R P G E K G S S D P E G K K R T	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G T P S S E K S	91
EL-14	D V T S V R P G K K G S S D P E G K K R -	Q Q A A K P G K G T P G Q Q K Q G G S S E Q S	92
CLL-412	D Q T S V R P G K K G S S D P E Q K K R T	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G T S S E Q S	93
LC3bPB	E V T G P R P G Q R G D S D P E Q K K R -	- Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G K S S E Q S	94
CLL1.69	D V T L L P P G Q R G D A D A E Q K K R -	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G K S S E Q S	95

Figura 16A.

Versiones de Cadena Ligera de My9-6 Humanizado

Kabat #	10	20	27b	34	44
muMy9-6	<u>NIMLTQSPSS</u>	LAVSAGEKVT	MSCKSSQSVF	FSSSQKNYLA	WYQQIPGQSP
huMy9-6 V1.0	<u>EIVLTQSPGS</u>	LAVSPGERVT	MSCKSSQSVF	FSSSQKNYLA	WYQQIPGQSP
huMy9-6 V1.1	N.M.				
huMy9-6 V1.2	N.M.				
huMy9-6 V1.3	E.V.				
huMy9-6 V1.4	N.M.				
huMy9-6 V1.5	N.M.				
huMy9-6 V1.6	E.V.				
huMy9-6 V1.7	E.V.				
huMy9-6 V1.8	E.M.				
huMy9-6 V1.9	E.M.				
huMy9-6 V1.10	E.M.				
huMy9-6 V1.11	E.M.				
huMy9-6 V1.12	N.V.				
huMy9-6 V1.13	N.V.				
huMy9-6 V1.14	N.V.				
huMy9-6 V1.15	N.V.				

Kabat #	54	64	74	84	94
muMy9-6	<u>KLLIYWASTR</u>	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQSEDLA	IYYCHQYLSS
huMy9-6 V1.0	<u>RLLIYWASTR</u>	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQPEDLA	IYYCHQYLSS
huMy9-6 V1.1	K.				
huMy9-6 V1.2	K.				
huMy9-6 V1.3	R.				
huMy9-6 V1.4	R.				
huMy9-6 V1.5	R.				
huMy9-6 V1.6	K.				
huMy9-6 V1.7	K.				
huMy9-6 V1.8	R.				
huMy9-6 V1.9	R.				
huMy9-6 V1.10	K.				
huMy9-6 V1.11	K.				
huMy9-6 V1.12	R.				
huMy9-6 V1.13	R.				
huMy9-6 V1.14	K.				
huMy9-6 V1.15	K.				

Kabat #	108	
muMy9-6	<u>RTFGGGTKLE</u>	IKR (SEQ ID NO:8)
huMy9-6 V1.0	<u>RTFGQGTKLE</u>	IKR (SEQ ID NO:10)
huMy9-6 V1.1		
huMy9-6 V1.2		
huMy9-6 V1.3		
huMy9-6 V1.4		
huMy9-6 V1.5		
huMy9-6 V1.6		
huMy9-6 V1.7		
huMy9-6 V1.8		
huMy9-6 V1.9		
huMy9-6 V1.10		
huMy9-6 V1.11		
huMy9-6 V1.12		
huMy9-6 V1.13		
huMy9-6 V1.14		
huMy9-6 V1.15		

Figura 16B

Versiones de Cadena Pesada de My9-6 Humanizado

Kabat #	10	20	30	40	50
muMy9-6	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SCKASGYTFT	SYIHWIKQT	PGQGLEWVGV
huMy9-6 V1.0	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SCKASGYTFT	SYIHWIKQT	PGQGLEWVGV
huMy9-6 V1.1	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.2	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.3	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.4	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.5	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.6	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.7	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.8	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.9	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.10	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.11	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.12	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.13	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.14	.....	.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.15	.....	.....	.....	.....	.....

Kabat #	59	69	79	86	96
muMy9-6	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCAREV
huMy9-6 V1.0	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCAREV
huMy9-6 V1.1	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.2	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.3	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.4	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.5	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.6	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.7	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.8	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.9	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.10	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.11	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.12	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.13	.....	...K.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.14	.....	...Q.....	.....	.....	.....
huMy9-6 V1.15	.....	...K.....	.....	.....	.....

Kabat #	105	112	
muMy9-6	RLRYFDVWGA	GTTVTVSS	(SEQ ID NO:7)
huMy9-6 V1.0	RLRYFDVWQ	GTTVTVSS	(SEQ ID NO:9)
huMy9-6 V1.1	.....	.....	
huMy9-6 V1.2	.....	.....	
huMy9-6 V1.3	.....	.....	
huMy9-6 V1.4	.....	.....	
huMy9-6 V1.5	.....	.....	
huMy9-6 V1.6	.....	.....	
huMy9-6 V1.7	.....	.....	
huMy9-6 V1.8	.....	.....	
huMy9-6 V1.9	.....	.....	
huMy9-6 V1.10	.....	.....	
huMy9-6 V1.11	.....	.....	
huMy9-6 V1.12	.....	.....	
huMy9-6 V1.13	.....	.....	
huMy9-6 V1.14	.....	.....	
huMy9-6 V1.15	.....	.....	

Figura 17

Valores de $K_D$ de My9-6			
	Directo en Membranas	Competitivo en Membranas	Directo en Células
	pM	pM	nM
murino	51.34±8.74	173.64±39.29	1.10±0.13
V1.0	66.53±17.83	209.00±52.37	1.02±0.04
V1.1	83.57±13.82	279.50±152.03*	1.07±0.11*
V1.3	63.95±0.64*	203.05±153.83*	1.16±0.39*
V1.6	56.10±15.13*	216.50±70.00*	0.97±0.08*

Figura 18

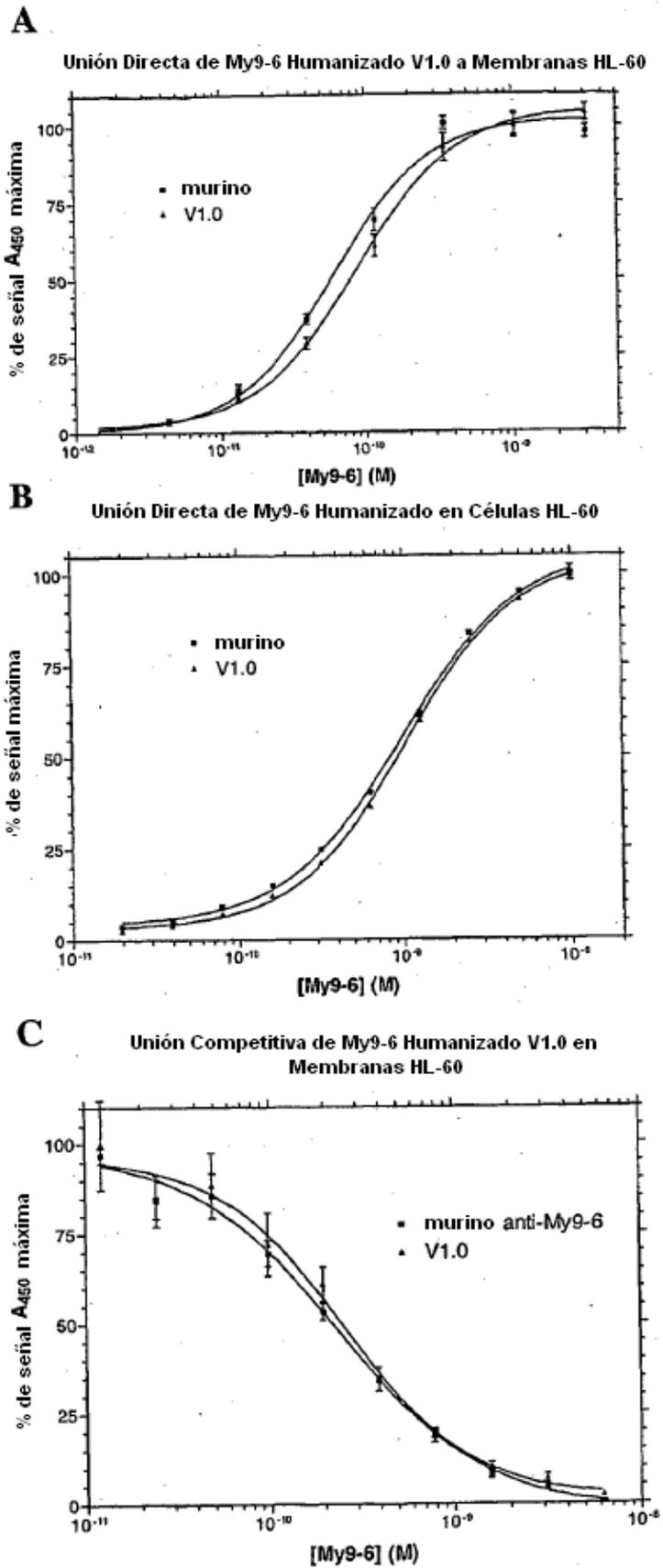


Figura 19

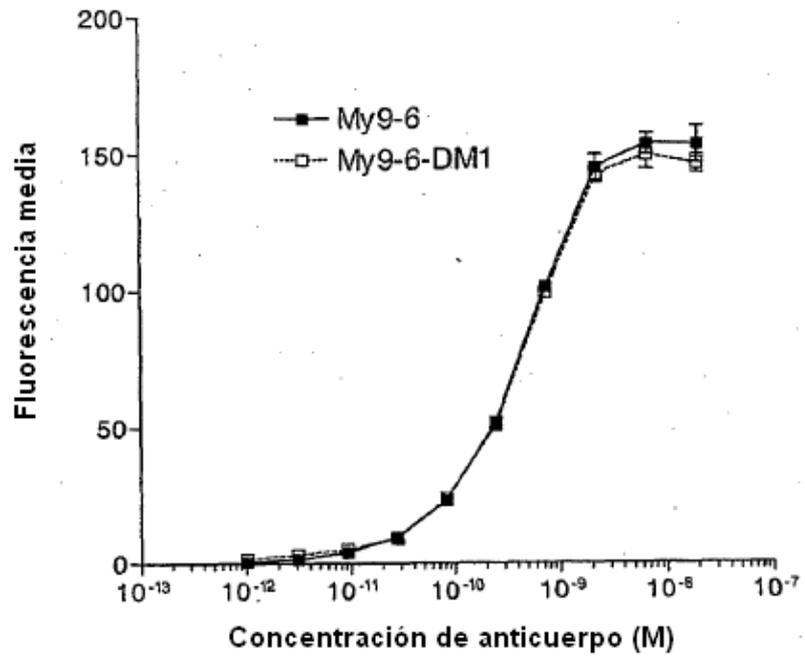


Figura 20

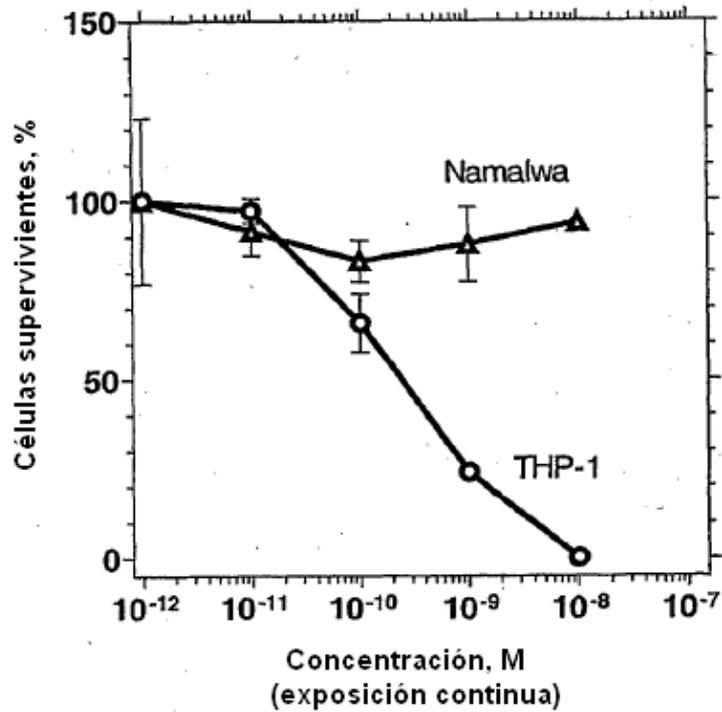


Figura 21

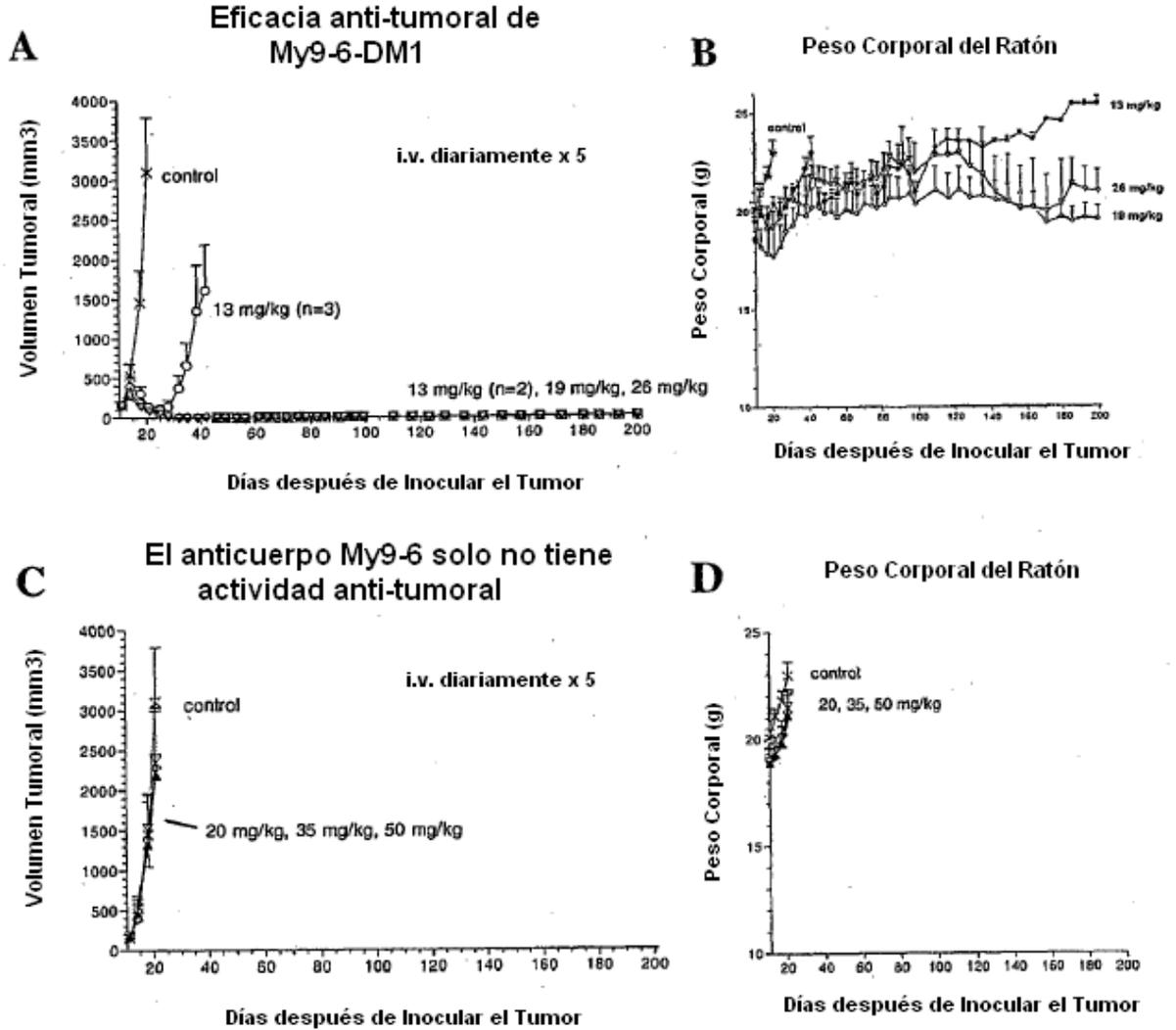
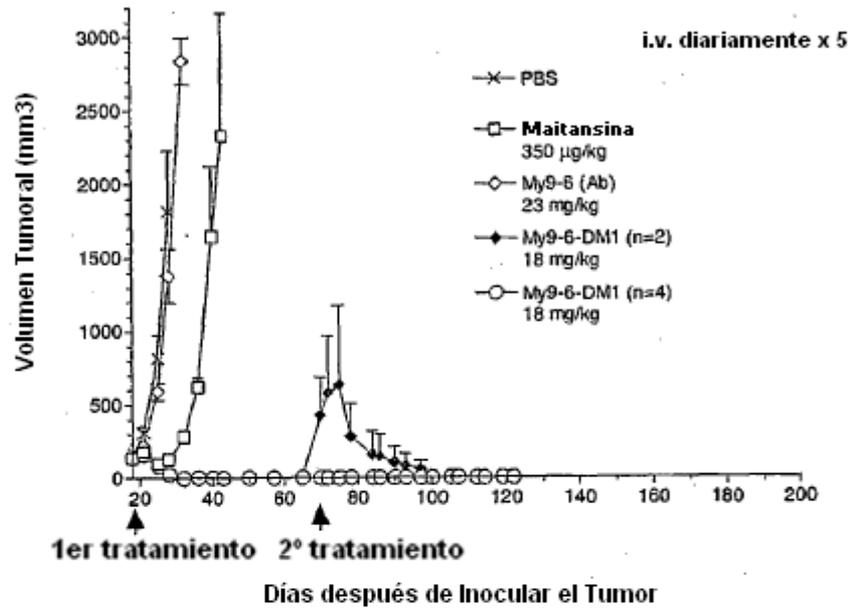


Figura 22

**A**



**B**

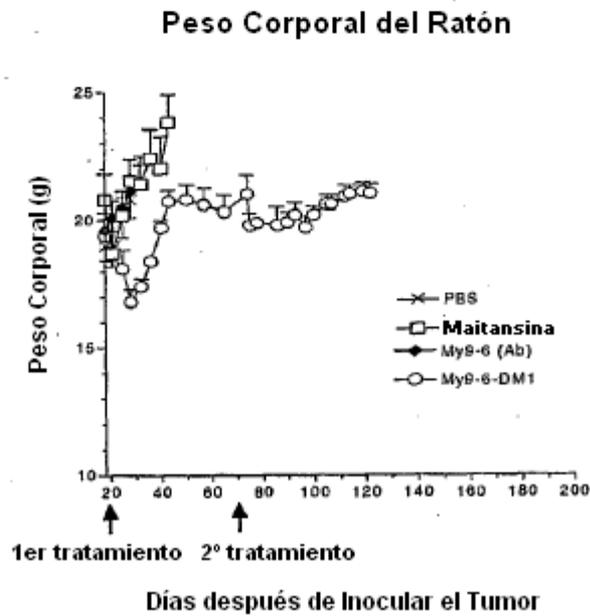


Figura 23A

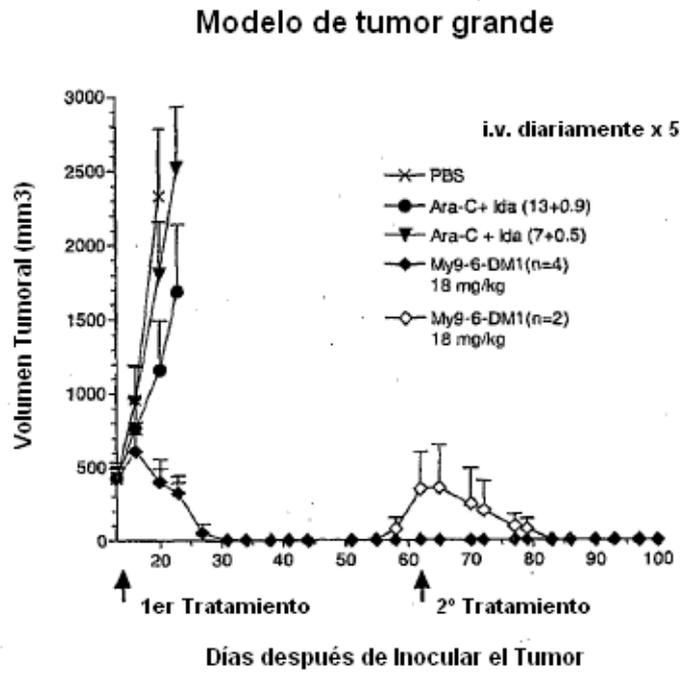


Figura 23B

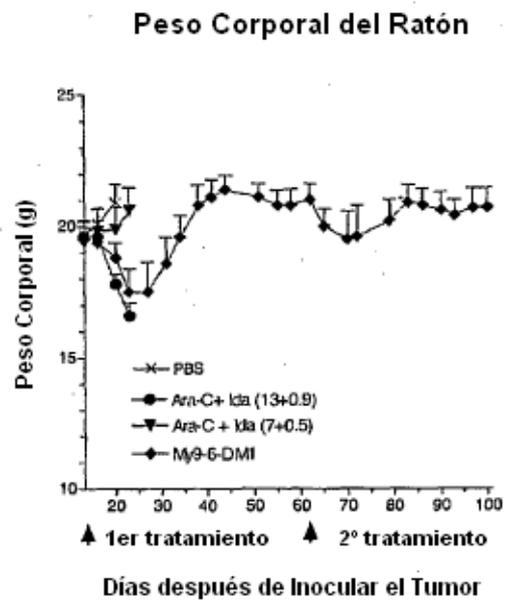


Figura 24A

Eficacia de My9-6-DM1 en el modelo de supervivencia

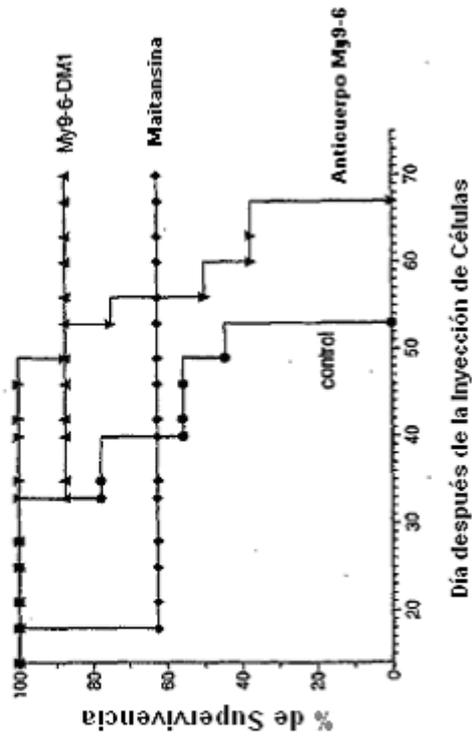


Figura 24B

Comparación de My9-6-DM1 con Gentuzumab Ozogamicina y quimioterapia estándar

