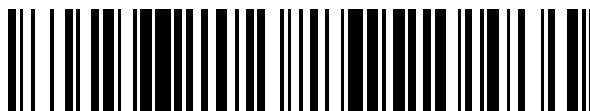


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 060**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2007 PCT/US2007/086152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2008 WO08070569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2007 E 07854887 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2097097**

54 Título: **Anticuerpos, en particular, anticuerpos humanos, que se unen a CD22 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

01.12.2006 US 868231 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2018

73 Titular/es:

**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08540 , US**

72 Inventor/es:

**KING, DAVID JOHN;
WITTE, ALISON;
LEBLANC, HEIDI N.;
THEOLIS, RICHARD;
MASOOD, ASNA;
YAMANAKA, MARK;
ZENS, KYRA D.;
DWIGGINS, SARA R.;
SPROUL, TIM;
RAO-NAIK, CHETANA;
PASSMORE, DAVID;
TOY, KRISTOPHER y
TANAMACHI, DAWN M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 678 060 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, en particular, anticuerpos humanos, que se unen a CD22 y usos de los mismos

5 Antecedentes

CD22 es una glicoproteína de la superficie celular de tipo I de la familia de las sialoadhesinas. CD22 también se conoce en la técnica como BL-CAM, B3, Leu-14 y Lyb-8, entre otros nombres. CD22 está inicialmente caracterizada por los anticuerpos dirigidos contra S-HCL-1 (Schwartz, R. *et al.* (1985) *Blood* 65:974-983), HD39 (Dorken, B. *et al.* (1986) *J. Immunol.* 136:4470-4479) y RFB4 (Campana, D. *et al.* (1985) *J. Immunol.* 134:1524-1530). CD22 se ha definido como una molécula de adhesión análoga a lectina que se une a ligandos que tienen ácido siálico con enlace alfa2,6, y es un regulador de la señalización del antígeno de linfocitos B (BCR, por sus siglas en inglés). Estructuralmente, existen diferentes variantes de corte y empalme para CD22, pero la forma predominante en seres humanos tiene una región extracelular que contiene varios dominios análogos a inmunoglobulinas.

Se ha demostrado que los linfocitos B expresan específicamente CD22, y es funcionalmente importante como regulador negativo de la activación de los linfocitos B (revisado por Nitschke, L. (2005) *Curr. Opin. Immunol.* 17:290-297 y Tedder, T.F. *et al.* (2005) *Adv. Immunol.* 88:1-50). En estudios que utilizaron ratones con direccionamiento génico que expresaban moléculas de CD22 mutante que no interactúan con ligandos de ácido siálico alfa2,6, se determinó que algunas funciones (tales como la expresión en la superficie celular de CD22, IgM y la clase II de MHC en linfocitos B maduros, mantenimiento de las poblaciones de linfocitos B de la zona marginal, proliferación óptima de linfocitos B inducida por el receptor de antígenos y tasas de renovación de linfocitos B) están regulados por la unión del ligando CD22, mientras que otras funciones (tales como la fosforilación de CD22, la regulación negativa de la movilización del calcio después del enlace de BCR realizada por CD22, el reclutamiento de SHP-1 en CD22 y la migración de linfocitos B) no necesitan implicación del ligando (Poe, J.C. *et al.* (2004) *Nat. Immunol.* 5:1078-1087).

CD22 se considera un correceptor inhibidor que modula por defecto la señalización de BCR estableciendo un umbral de la señalización que evita la estimulación excesiva de los linfocitos B. La activación de dicho correceptor inhibidor se produce mediante la fosforilación en los ITIM (motivos de inhibición del receptor basados en tirosina, por sus siglas en inglés) citoplásmicos, seguido por el reclutamiento de la tirosina fosfatasa SHP-1 o la fosfatasa lípida SHIP (revisado en Nitschke, L. (2005) *Curr. Opin. Immunol.* 17:290-297). Adicionalmente, se ha descubierto que CD22 tiene un papel fundamental en el bucle de regulación que controla la ruta de amplificación CD19/CD21-Src-familia de la proteína tirosina quinasa (PTK) que regula los umbrales de la señalización basal e intensifica la activación de Src-familia quinasa tras la unión de BCR (revisado en Tedder, T.F. *et al.* (2005) *Adv. Immunol.* 88:1-50).

Aproximadamente un 60-80 % de neoplasias de linfocitos B malignas expresan CD22, convirtiéndola por tanto en una posible diana para la inmunoterapia pasiva (véase por ejemplo, Cesano, A. y Gayko, U. (2003) *Semin. Oncol.* 30:253-257). Además, la modulación selectiva de la actividad de los linfocitos B mediante el direccionamiento de CD22 se ha sugerido como un medio para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias (véase por ejemplo, Steinfeld, S.D. y Youinou, P. (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6:943-949). Se ha descrito un anticuerpo monoclonal de murino dirigido contra CD22 (documento WO 03/072736 A2). Un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD22 humanizado, epratuzumab, se ha descrito (Coleman, M. *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:3991S-3994S; documento WO00/74718). Además, se ha descrito epratuzumab conjugado con una citotoxina (Dijoseph, J.F. *et al.* (2004) *Blood*. 103(5): 1807-1814; Carnahan, J. *et al.* (2006) *Mol. Immunol.* 44:1331-1341; Leonard, J.P. *et al.* (2007) *Oncogene* 26(25):3704-3713). Sin embargo, siguen siendo necesarios reactivos contra CD22.

Sumario

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porciones de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une a CD22 humano, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:2;
- (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:6 o 60;
- (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:10;
- (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:14;
- (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:20; y
- (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:26.

Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, se describen más detalladamente en lo sucesivo.

Los anticuerpos de la invención presentan numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen elevada afinidad de unión a CD22, la capacidad de internalizarse en células CD22+, la capacidad de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la capacidad de potenciar la muerte celular de células Ramos inducida mediante estimulación del receptor de linfocitos B (BCR), y/o de inhibir el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjugan con una citotoxina. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para tratar neoplasias malignas de linfocitos B CD22+ y/o para tratar diferentes trastornos inflamatorios o autoinmunitarios.

En un aspecto, el anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, presenta al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) se internaliza en células CD22⁺;
- (b) presenta citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células CD22⁺;
- (c) potencia la muerte celular de células Ramos inducida mediante estimulación del receptor de linfocitos B (BCR); y
- (d) inhibe el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjugan con una citotoxina.

En otra realización, el anticuerpo presenta al menos dos de las propiedades (a), (b), (c) y (d). En otra realización más, el anticuerpo presenta tres de las propiedades (a), (b), (c) y (d).

En otra realización, el anticuerpo presenta las cuatro propiedades (a), (b), (c), y (d). En determinadas realizaciones, el anticuerpo no tiene un efecto antiproliferativo directo en células Ramos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no induce el flujo de calcio en células Ramos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células Ramos. Preferentemente, el anticuerpo se une a CD22 humana con elevada afinidad, *por ejemplo*, con una K_D de 1×10^{-7} M o menos o una K_D de 1×10^{-8} M o menos o una K_D de 1×10^{-9} M o menos o una K_D de 1×10^{-10} o menos o una K_D de 7×10^{-11} o menos.

Además, un anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se describe en el presente documento, que compite de forma cruzada por la unión a CD22 con un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 o 61 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36.

Preferentemente, este anticuerpo también tiene una o más de las siguientes características: se internaliza en células CD22+, media la actividad ADCC y/o potencia la muerte celular de células Ramos inducida mediante estimulación del receptor del BCR, y/o inhibe el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjugan con una citotoxina.

Otros anticuerpos preferidos, o porciones de unión a antígeno del mismo, comprenden:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:32 o 61; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan anticuerpos, o porciones de unión a antígeno del mismo, que compiten por la unión a CD22 con cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados.

Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de un isotipo IgG1 o IgG4. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios.

La presente invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radioactivo. En una realización particularmente preferida, la invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, unido a un compuesto "Citotoxina A" (por ejemplo, mediante un enlace tiol). La presente divulgación también proporciona una molécula bispecífica que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente divulgación, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la de dicho anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.

Las composiciones que comprenden un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o inmunoconjugado de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable también están comprendidos en el alcance de la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la

presente invención, también están incluidos en la presente invención, así como los vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y las células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión. Los métodos para preparar anticuerpos dirigidos contra CD22 usando células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión también están comprendidos en el alcance de la invención y pueden incluir las etapas de (i) expresar el anticuerpo en la célula hospedadora y (ii) aislar el anticuerpo de la célula hospedadora.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en métodos para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD22. El método comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa CD22 con un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, de tal forma que el crecimiento de la célula tumoral que expresa CD22 queda inhibido. La célula tumoral puede ser, por ejemplo, un linfoma de linfocitos B, tal como un linfoma no de Hodgkin. En determinadas realizaciones, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, está conjugado con un agente terapéutico, tal como una citotoxina.

Otro aspecto de la invención se refiere al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en métodos para tratar un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, de tal forma que el trastorno inflamatorio o autoinmunitario del sujeto se trate. El trastorno autoinmunitario puede ser, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.

La presente invención también proporciona conjugados de molécula ligando-anticuerpo dirigido contra CD22 aislado que comprende el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención que se unen específicamente a CD22 con elevada afinidad. Algunos de estos conjugados de molécula ligando-anticuerpo pueden internalizarse en células que expresan CD22 y son capaces de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. La presente invención también proporciona el conjugado de molécula ligando-anticuerpo dirigido contra CD22 para su uso en métodos para tratar cánceres, tales como el linfoma de linfocitos B, tal como un linfoma no de Hodgkin, mediante el uso de un conjugado de molécula ligando-anticuerpo dirigido contra CD22 divulgado en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, de tal forma que el trastorno inflamatorio o autoinmunitario del sujeto se trate. Los ejemplos no limitativos de trastornos autoinmunitarios preferidos incluyen lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. Otros ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino (incluidas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn), diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis autoinmunitaria (incluidas la enfermedad de Grave y la tiroiditis de Hashimoto), psoriasis y glomerulonefritis.

Las composiciones que comprenden el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención conjugada con una molécula ligando de la presente invención también se proporcionan. Las moléculas ligando que se pueden conjugar ventajosamente con el anticuerpo del conjugado de molécula ligando-anticuerpo, tal como se divulgan en el presente documento, incluyen, aunque no de forma limitativa, moléculas como fármacos, toxinas, moléculas marcadoras (por ejemplo, radioisótopos), proteínas y agentes terapéuticos. También se divulgan en el presente documento composiciones que comprenden conjugados de molécula ligando-anticuerpo y vehículos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, dichos conjugados de molécula ligando-anticuerpo se conjugan mediante enlazadores químicos. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador peptídico, y se representa gráficamente en el presente documento como (L4)p—F—(L1)m. Otros enlazadores incluyen enlazadores de hidrazina y disulfuro, y se representa gráficamente en el presente documento como (L4)p—H—(L1)m o (L4)p—J—(L1)m, respectivamente. Además de los enlazadores que se unen al ligando, la presente invención proporciona también brazos conectores escindibles que son adecuados para su unión a prácticamente cualquier especie molecular.

En otro aspecto, la invención se refiere al conjugado de molécula ligando-anticuerpo de la invención para su uso en un método de inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD22. El método comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa CD22 con un conjugado de molécula ligando-anticuerpo de la divulgación de forma que se inhiba el crecimiento de la célula tumoral que expresa CD22. En una realización preferida, la molécula ligando es un agente terapéutico, tal como una citotoxina. Las células tumorales que expresan CD22 especialmente preferidas son linfomas de linfocitos B, tal como un linfoma no de Hodgkin. Otros tipos de células tumorales que expresan CD22 incluyen linfoma de Burkitt y leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B. En otras realizaciones adicionales, la célula tumoral que expresa CD22 procede de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en linfomas de Burkitt y leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B.

En otro aspecto, la invención se refiere al conjugado de molécula ligando-anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto un conjugado de molécula ligando-anticuerpo de la divulgación de tal forma que se trate el cáncer del sujeto. En una realización preferida, la

molécula ligando es un agente terapéutico, tal como una citotoxina. Los cánceres especialmente preferida para el tratamiento son los linfomas de linfocitos B, tal como un linfoma no de Hodgkin. Otros tipos de cánceres incluyen linfomas de Burkitt y leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B.

- 5 Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:41) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:31) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 12C5. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:1), CDR2 (SEQ ID NO:5) y CDR3 (SEQ ID NO:9) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.
- 15 La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:45) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:35) de la región variable de la cadena ligera lambda del anticuerpo monoclonal humano 12C5. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:13), CDR2 (SEQ ID NO:19) y CDR3 (SEQ ID NO:25) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- 20 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:42) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:32) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 19A3, y la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de anticuerpo recombinante CD22.1. Las secuencias de la región variable de la cadena pesada de 19A3 son idénticas a las de CD22.1. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:2), CDR2 (SEQ ID NO:6) y CDR3 (SEQ ID NO:10) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.
- 25 La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:46) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:36) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 19A3, y las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano CD22.1 recombinante. Las secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa de CD22.1 y CD22.2 son idénticas a las de 19A3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:14), CDR2 (SEQ ID NO:20) y CDR3 (SEQ ID NO:26) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- 30 La Figura 2C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:62) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:61) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano CD22.2 recombinante. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:2), CDR2 (SEQ ID NO:60) y CDR3 (SEQ ID NO:10) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- 35 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:43) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:33) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 16F7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:3), CDR2 (SEQ ID NO:7) y CDR3 (SEQ ID NO:11) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.
- 40 La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:47) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:37) de la región variable de la cadena ligera kappa V_{κ} .1 del anticuerpo monoclonal humano 16F7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:15), CDR2 (SEQ ID NO:21) y CDR3 (SEQ ID NO:27) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- 45 La Figura 3C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:48) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:38) de la región variable de la cadena ligera kappa V_{κ} .2 del anticuerpo monoclonal humano 16F7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:16), CDR2 (SEQ ID NO:22) y CDR3 (SEQ ID NO:28) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:44) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:34) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 23C6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:8) y CDR3 (SEQ ID NO:12) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.
- 50 La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:49) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:39) de la región variable de la cadena ligera kappa V_{κ} .1 del anticuerpo monoclonal humano 23C6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:17), CDR2 (SEQ ID NO:23) y CDR3 (SEQ ID NO:29) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- 55 La Figura 4C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:50) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:40) de la región variable de la cadena ligera kappa V_{κ} .2 del anticuerpo monoclonal humano 23C6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:18), CDR2 (SEQ ID NO:24) y CDR3 (SEQ ID NO:30) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.
- 60 La Figura 5A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de 12C5 (SEQ ID NO:31) con la secuencia de aminoácidos de V_H 7-4.1 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:51).
- La Figura 5B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 12C5 (SEQ ID NO:35) con la secuencia de aminoácidos de V_{λ} 2b2 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:55).
- 65 La Figura 6A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de 19A3/CD22.1 (SEQ ID NO:32) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:52).

La Figura 6B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de 19A3/CD22.1/CD22.2 (SEQ ID NO:36) con la secuencia de aminoácidos de V_K L6 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:56).

La Figura 6C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de CD22.2 (SEQ ID NO:61) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:52).

La Figura 7A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de 16F7 (SEQ ID NO:33) con la secuencia de aminoácidos de V_H 5-51 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:53).

La Figura 7B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera V_K1 de 16F7 (SEQ ID NO:37) de la secuencia de aminoácidos de V_K A27 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:57).

La Figura 7C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera V_K2 de 16F7 (SEQ ID NO:38) de la secuencia de aminoácidos de V_K A10 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:57).

La Figura 8A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de 23C6 (SEQ ID NO:34) con la secuencia de aminoácidos de V_H 1-69 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:54).

La Figura 8B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera V_K1 de 23C6 (SEQ ID NO:39) y la región variable de la cadena ligera V_K2 de 23C6 (SEQ ID NO:40) de la secuencia de aminoácidos de V_K L6 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:56).

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra la internalización de los anticuerpos dirigidos contra CD22 humana 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6 en células Raji.

La Figura 10A es un gráfico que muestra la actividad ADCC (medida según el % lisis) de los anticuerpos dirigidos contra CD22 humana 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6 contra células Daudi.

La Figura 10B es un gráfico que muestra la actividad ADCC (medida según el % lisis) de los anticuerpos dirigidos contra CD22 humana 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6 contra células Raji.

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra el efecto de los anticuerpos dirigidos contra CD22 humana inmovilizados 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6 en células Ramos estimuladas con BCR, medido según el % muerte celular.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la unión del ECD de CD22 mediante los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 humanos recombinantes dirigidos contra CD22 en comparación con el anticuerpo precursor 19A3 humano.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la unión de CD22 expresada sobre la superficie de células CHO mediante los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 humanos recombinantes dirigidos contra CD22.

La Figura 14 es un gráfico que muestra la unión de CD22 expresada sobre la superficie de células Raji mediante los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 humanos recombinantes dirigidos contra CD22.

La Figura 15 es un gráfico de barras que muestra la unión de los dominios 1 y 2 del extremo N del ECD de CD22 mediante los anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6, y mediante los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 humanos recombinantes dirigidos contra CD22.

La Figura 16 muestra el efecto in vivo de los conjugados de anticuerpo-fármaco CD22.1-Citotoxina A y CD22.2-Citotoxina A sobre el tamaño del tumor en células Raji en ratones SCID.

La Figura 17A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:87) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:81) del anticuerpo 4G6 humano. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:66) y CDR3 (SEQ ID NO:69) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.

La Figura 17B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:90) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:84) de la región variable de la cadena ligera kappa V_K1 del anticuerpo monoclonal humano 4G6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:72), CDR2 (SEQ ID NO:75) y CDR3 (SEQ ID NO:78) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 17C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:91) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:85) de la región variable de la cadena ligera kappa V_K2 del anticuerpo monoclonal humano 4G6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:73), CDR2 (SEQ ID NO:76) y CDR3 (SEQ ID NO:79) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 18A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:88) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:82) de la región variable de la cadena pesada V_H1 del anticuerpo monoclonal humano 21F6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:64), CDR2 (SEQ ID NO:67) y CDR3 (SEQ ID NO:70) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.

La Figura 18B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:89) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:83) de la región variable de la cadena pesada V_H2 del anticuerpo monoclonal humano 21F6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:65), CDR2 (SEQ ID NO:68) y CDR3 (SEQ ID NO:71) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.

La Figura 18C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:92) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:86) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal 21F6 humano. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:77) y CDR3 (SEQ ID NO:80) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 19A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de 4G6 (SEQ ID NO:81) con la secuencia de aminoácidos de V_H 1-69 de la línea germinal humana (SEQ

ID NO:54).

La Figura 19B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera V_{κ} .1 kappa de 4G6 (SEQ ID NO:84) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} L18 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:93).

La Figura 19C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera V_{κ} .2 kappa de 4G6 (SEQ ID NO:85) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} A27 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:57).

La Figura 20A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada V_H .1 de 21F6 (SEQ ID NO:82) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:52).

La Figura 20B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada H_2 de 21F6 (SEQ ID NO:83) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 con la línea germinal humana (SEQ ID NO:52).

La Figura 20C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa de 21F6 (SEQ ID NO:86) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} L6 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:56).

La Figura 21 es un gráfico que muestra la unión de CD22 expresada sobre la superficie de células CHO mediante el anticuerpo dirigido contra CD22 humana 4G6.

La Figura 22 es un gráfico que muestra la unión de CD22 expresada sobre la superficie de células CHO mediante el anticuerpo dirigido contra CD22 humana 21F6.

La Figura 23 es un gráfico que muestra la unión de CD22 expresada sobre la superficie de células Raji mediante el anticuerpo dirigido contra CD22 humana 21F6.

Descripción detallada de las presentes divulgaciones

La presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porciones de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une a CD22 humano, que comprende:

(g) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:2;

(h) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:6 o 60;

(i) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 10;

(j) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:14;

(k) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:20; y

(l) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:26.

El anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno del mismo, se describe más detalladamente en lo sucesivo.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos se derivan de secuencias específicas de las cadenas ligeras y pesadas de la línea germinal, y comprenden rasgos estructurales y comprenden rasgos estructurales específicos tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos específicas. La invención proporciona anticuerpos aislados, conjugados de inmuno-molécula ligando, moléculas biespecíficas, aficuerpos, anticuerpos de dominio, nanocuerpos y unicuerpos, métodos para fabricar dichas moléculas, y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas y vehículos farmacéuticos. La divulgación se refiere también a métodos para usar las moléculas, tales como para detectar CD22, así como a los anticuerpos de la invención para su uso en un método para modular la actividad de los linfocitos B en enfermedades o trastornos asociados con la expresión de CD22 o que implican la regulación de linfocitos B, tales como tumores CD22+ y trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. La invención también proporciona métodos para utilizar los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente invención para inhibir el crecimiento de células tumorales CD22+, por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente invención para su uso en un método para tratar linfomas de linfocitos B. Adicionalmente, la invención proporciona anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente invención para su uso en métodos de utilizar los anticuerpos dirigidos contra CD22 para tratar trastornos inflamatorios o autoinmunitarios.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar determinados términos. Se proporcionan definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Los términos "CD22," "BL-CAM," "B3," "Leu-14" y "Lyb-8" se utilizan indistintamente, e incluyen variantes, isoformas, y especies homólogas de CD22. Por consiguiente, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden, en determinados casos, reaccionar en cruzado con CD22 procedentes de especies no humanas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden ser totalmente específicos de la CD22 humana, y es posible que no presente

otras especies u otros tipos de reactividad cruzada de tipo no humano. La secuencia de aminoácidos completa de una CD22 humana ilustrativa tiene el número de registro de GenBank NP_001762 (SEQ ID NO:59).

La secuencia CD22 humana puede diferir de la secuencia CD22 humana de la SEQ ID NO:59 por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas, y la CD22 tiene prácticamente la misma función biológica que la CD22 humana de la SEQ ID NO:59. Por ejemplo, una función biológica de la CD22 humana es tener un epítipo en el dominio extracelular de CD22 que se une específicamente a un anticuerpo de la presente divulgación o una función biológica de la CD22 humana es modular la señalización del BCR.

Una secuencia de CD22 humana concreta será generalmente al menos un 90 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la CD22 humana de la SEQ ID NO:59 y contiene los restos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de CD22 de otras especies (por ejemplo, de murino). En determinados casos, una CD22 humana puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a la CD22 de la SEQ ID NO:59. En determinadas realizaciones, una secuencia de CD22 humana no mostrará más de 10 diferencias en sus aminoácidos respecto de la CD22 de la SEQ ID NO:59. En determinadas realizaciones, la CD22 humana puede no presentar más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos respecto de la CD22 de la SEQ ID NO:59. El porcentaje de identidad puede determinarse como se describe en el presente documento.

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, fagocito, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las anteriores células o el hígado (incluidos anticuerpos, citoquinas, y complemento) que da como resultado un daño selectivo en, la destrucción de, o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de auto inmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de la señal" se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de la señal que tienen un papel en la transmisión de una señal desde una parte de una célula a otra parte de una célula. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de la superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de la superficie celular" de la presente divulgación es la proteína CD22.

El término "anticuerpo" tal como se cita en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno) o sus cadenas individuales. Un anticuerpo se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) conectadas entres sí mediante enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada una de las V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas en el siguiente orden, desde el extremo amino al extremo carboxi: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluidas diferentes células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente la "porción del anticuerpo"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD22). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase Fundamental Immunology (Paul ed., 3ª ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes independientes, estos se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite conformar una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarias (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos

monocatenarios estén comprendidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas de los expertos en la materia y se seleccionan según su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

5 La abreviatura "V_K", tal como se usa en el presente documento, se refiere al dominio variable de una cadena ligera kappa, mientras que la abreviatura "V_λ", tal como se usa en el presente documento, se refiere al dominio variable de una cadena ligera lambda. La abreviatura "V_L", tal como se usa en el presente documento, se refiere al dominio variable de una cadena ligera de inmunoglobulina y por tanto abarca ambas cadenas ligeras V_K y V_λ.

10 Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está prácticamente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de manera específica a CD22 está prácticamente exento de anticuerpos que se unen de manera específica a antígenos que no sean CD22). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD22 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas CD22 procedentes de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar prácticamente exento de otros materiales celulares y/o químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítipo concreto.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones del marco como las regiones CDR se deriven de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y dirigida a sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que expresan una única especificidad de unión, que tiene regiones variables en las que tanto las regiones marco como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, *por ejemplo*, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de las inmunoglobulinas humanas o un hibridoma preparado a partir de las mismas (descrito con mayor detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, *por ejemplo*, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones del marco y las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones de V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de una línea germinal humana, pueden no existir de manera natural en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico de un antígeno" se utilizan de manera indistinta en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, *por ejemplo*, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Se pretende que el término "anticuerpo humanizado" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la CDR

derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales en la región marco dentro de las secuencias del marco humanas.

5 Se pretende que el término "anticuerpo quimérico" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo, en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

10 La expresión "mimético de anticuerpo" pretende referirse a moléculas capaces de imitar la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno, pero que no está limitado a las estructuras de anticuerpos naturales. Los ejemplos de dichos miméticos de anticuerpo incluyen, aunque no de forma limitativa, aficuerpos, DARPin, anticalinas, avimeros, y versacuerpos, donde todos ellos emplean estructuras de unión que, aunque imitan la unión de los anticuerpos tradicionales, se generan a partir de, y funcionan, por mecanismos diferentes.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula ligando" se refiere a la entidad con la que se conjuga un anticuerpo en un conjugado de anticuerpo-molécula ligando. Los ejemplos de moléculas ligando incluyen fármacos, toxinas, moléculas marcadoras (incluidos, aunque no de forma limitativa, marcadores peptídicos o de molécula pequeña tales como marcadores fluorocromos, así como marcadores monoatómicos tales como radioisótopos), proteínas y agentes terapéuticos.

20 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que un anticuerpo se "une específicamente a una proteína CD22 humana" se refiera a un anticuerpo que se une a una CD22 humana (y posiblemente una CD22 de una o más especies humanas) pero que no se une sustancialmente a proteínas no CD22. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une específicamente a la CD22 humana de la SEQ ID NO:59 o una variante de la misma. Preferentemente, el anticuerpo se une a la CD22 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 5×10^{-9} M o menos, más preferentemente 1×10^{-9} M o menos, incluso más preferentemente 5×10^{-10} M o menos, e incluso más preferentemente 7×10^{-11} o menos.

30 El término "no se une sustancialmente" a una proteína o células, tal como se usa en el presente documento, significa que no se une o no se une con elevada afinidad a la proteína o las células, es decir, se une a la proteína o las células con una K_D de 1×10^{-6} M o más, más preferentemente 1×10^{-5} M o más, más preferentemente 1×10^{-4} M o más, más preferentemente 1×10^{-3} M o más, incluso más preferentemente 1×10^{-2} M o más.

35 Se pretende que el término " K_{asoc} " o " K_a ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta, mientras que se pretende que el término " K_{dis} " o " K_d ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se pretende que el término " K_d ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la primera constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D se pueden determinar para anticuerpos utilizando métodos bien establecidos en la materia. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizar la resonancia de plasmón superficial, preferentemente mediante el uso de un sistema de biodetección tal como el sistema Biacore®.

45 Tal como se usa en el presente documento, El término "elevada afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferentemente 5×10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente 5×10^{-9} M o menos e incluso más preferentemente 1×10^{-9} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión con "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión con "elevada afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menos, más preferentemente 10^{-7} M o menos, incluso más preferentemente 10^{-8} M o menos.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, *por ejemplo*, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

55 El símbolo "-", ya se utilice como un enlace o se muestre perpendicular a un enlace, indica el punto en el cual resto mostrado está unido al resto de la molécula, soporte sólido, etc.

60 El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, salvo que se indique de otra forma, una cadena lineal o ramificada, o un radical hidrocarburo cíclico, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, monosaturado o polinsaturado y puede incluir radicales divalentes y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir C_1 - C_{10} significa de uno a diez átomos de carbono). Los ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen,

aunque no de forma limitativa, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1-propinilo y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique otra cosa, pretende también incluir aquellos derivados de alquilo definidos con mayor detalle a continuación, tal como heteroalquilo. Los grupos alquilo, que están limitados a grupos hidrocarburo, se denominan

5 "homoalquilo".

El término "alquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ilustra, aunque no de forma limitativa, por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e incluye adicionalmente aquellos grupos descritos a continuación como "heteroalquileo". Normalmente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a

10 24 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o junto con otro término, significa, salvo que se indique de otra forma, una

15 cadena lineal o ramificada estable, o un radical hidrocarburo cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en O, N, Si, y S, y en el que el los átomos de nitrógeno, carbono y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomo(s) O, N, S, y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual el grupo alquilo está unido

20 al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$, y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. De manera similar, el término "heteroalquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ilustra, aunque no de

25 forma limitativa por, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxo, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Los términos "heteroalquilo" y "heteroalquileo" abarcan poli(etilenglicol) y sus derivados (véase, por ejemplo, Shearwater Polymers Catalog, 2001). Adicionalmente, para los grupos enlazantes de alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de enlace está implícita en la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ representa tanto $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ como $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$.

30

El término "inferior" junto con los términos "alquilo" o "heteroalquilo" se refieren a un resto que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

35 Los términos "alcoxi", "alquilamino", "alquilsulfonilo", y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino, un grupo SO_2 o un átomo de azufre, respectivamente. El término "arilsulfonilo" se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula mediante un grupo SO_2 , y el término "sulfhidrilo" se refiere a un grupo SH.

40 En general, un "sustituyente acilo" también se selecciona entre el grupo que se ha definido anteriormente. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sustituyente acilo" se refiere a los grupos unidos, y que cumplen la valencia, de un carbono carbonilo que está unido directa o indirectamente al núcleo policíclico de los compuestos de la presente invención.

45 Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o junto con otros términos, representan, salvo que se indique de otra forma, versiones cíclicas de "alquilo" sustituido o no sustituido y "heteroalquilo" sustituido o no sustituido, respectivamente. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo se une al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, aunque no de forma limitativa, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Los heteroátomos y los átomos de carbono de las estructuras cíclicas están opcionalmente oxidados.

55 Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, salvo que se indique de otra forma, un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo. Adicionalmente, se pretende de términos tales como "haloalquilo" incluyan monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, se pretende que el término "haloalquilo($\text{C}_1\text{-C}_4$)" incluya, aunque no de forma limitativa, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

60 El término "arilo" significa, salvo que se indique de otra forma, un sustituyente hidrocarburo aromático poliinsaturado sustituido o no sustituido que puede tener un único anillo o múltiples anillos (preferentemente, de 1 a 3 anillos) que están condensados entre sí o unirse covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O, y S, en el que los átomos de nitrógeno, carbono y azufre están opcionalmente oxidados y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de

65

grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación. "Arilo" y "heteroarilo" también abarcan sistemas de anillo en los que uno o más sistemas de anillos no aromáticos se condensan, o se unen de otra manera, a un sistema de anillo de arilo o heteroarilo.

En resumen, el término "arilo" cuando se usa junto con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye anillos de arilo y heteroarilo como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, se pretende que el término "arilalquilo" incluya aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluidos aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha sustituido por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo" incluyen formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

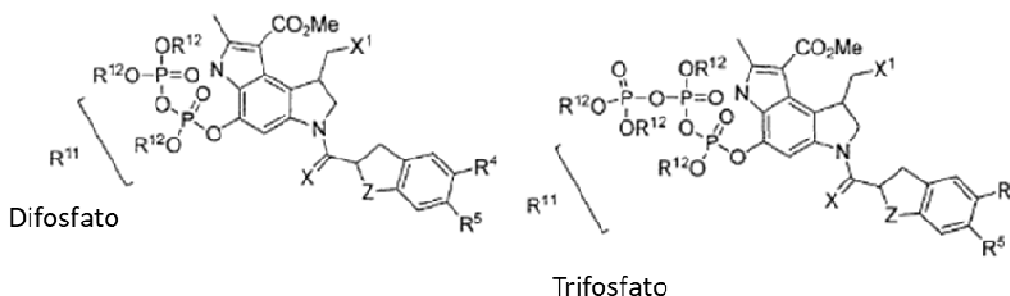
Los sustituyentes de los radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos aquellos grupos denominados a menudo como alquilenilo, alqueno, heteroalquilenilo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, y heterocicloalqueno) se denominan de forma general como "sustituyentes alquilo" y "sustituyentes heteroalquilo", respectivamente, y pueden ser uno o más de varios grupos seleccionados entre, aunque no de forma limitativa: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R' -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)₂R' -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número comprendido entre cero y (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. Cada uno de R', R'', R''' y R'''' se refiere independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido por 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente para cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, se entiende que -NR'R'' incluye, aunque no de forma limitativa, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Según el anterior análisis de los sustituyentes, un experto en la materia comprenderá que se entiende que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes a los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

Análogamente a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes arilo y los sustituyentes heteroarilo se denominan generalmente como "sustituyentes arilo" y "sustituyentes heteroarilo", respectivamente, y son una variedad y se seleccionan entre, por ejemplo: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)₂R', -NR-CCNR'R''=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi(C₁-C₄), y fluoroalquilo (C₁-C₄), en un número comprendido entre cero y el número total de valencias disponibles en el sistema de anillo aromático; y donde R', R'', R''' y R'''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituido, (arilo no sustituido)-alquilo(C₁-C₄), y (arilo no sustituido)oxi-alquilo(C₁-C₄). Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente para cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente.

Dos de los sustituyentes arilo en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en la que T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes de los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede sustituirse opcionalmente por un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de fórmula -(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-.

Preferentemente, los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) sustituido o no sustituido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "difosfato" incluye, aunque no de forma limitativa, un éster de ácido fosfórico que contiene dos grupos fosfato. El término "trifosfato" incluye aunque no de forma limitativa un éster de ácido fosfórico que contiene tres grupos fosfato. Por ejemplo, los fármacos concretos que tienen un difosfonato o un trifosfato incluyen:



Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente que se ha seleccionado entre alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y grupos heterocíclicos sustituidos o no sustituidos.

Diversos aspectos de la presente divulgación se describen con más detalle en los siguientes subapartados.

Anticuerpos dirigidos contra CD22

Los anticuerpos de la presente divulgación se caracterizan por rasgos funcionales particulares o propiedades de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a CD22 humana. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a CD22 humana con elevada afinidad, por ejemplo, con una K_D de 1×10^{-7} M o menos.

Los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente divulgación presentan preferentemente una o más de las siguientes características:

- (a) se internalizan en células CD22⁺;
- (b) presentan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células CD22⁺;
- (c) potencian la muerte celular de células Ramos inducida mediante estimulación del receptor de linfocitos B (BCR), e
- (d) inhibe el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjugan con una citotoxina.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo presenta al menos dos de las propiedades (a), (b), (c) y (d). En otra realización más, el anticuerpo presenta tres de las propiedades (a), (b), (c) y (d). En otra realización, el anticuerpo presenta las cuatro propiedades (a), (b), (c), y (d).

Aunque los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la divulgación presentan determinadas propiedades funcionales, en determinadas realizaciones, otro rasgo de los anticuerpos es que no presentan otras propiedades funcionales concretas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el anticuerpo no tiene un efecto antiproliferativo directo en células Ramos. En otras realizaciones, el anticuerpo no induce el flujo de calcio en células Ramos. En otras realizaciones más, el anticuerpo no media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células Ramos.

Se indica que se ha notificado que un anticuerpo dirigido contra CD22 humanizado, epratuzumab, carece de un efecto antiproliferativo directo y de actividad CDC contra líneas de células de linfoma no de Hodgkin, aunque el anticuerpo medió efectos citotóxicos contra las líneas de células por otros medios (véase Carnahan, J. *et al.* (2006) *Mol. Immunol.* 44:1331-13411).

Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CD22 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, se une a CD22 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a CD22 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, se une a CD22 humana con una K_D de 3×10^{-9} M o menos, se une a CD22 humana con una K_D de 1×10^{-9} M o menos, o se une a CD22 humana con una K_D de 5×10^{-10} M o menos, o se une a CD22 humana con una K_D de 1×10^{-10} o se une a CD22 humana con una K_D de 7×10^{-11} M o menos.

Se conocen en la técnica ensayos normalizados para evaluar la afinidad de unión de los anticuerpos frente a CD22 humana, incluyendo, por ejemplo, análisis ELISA y BIAcore con CD22 recombinante (véase el Ejemplo 3). Los Ejemplos también proporcionan descripciones detalladas de ensayos adecuados para evaluar la internalización de anticuerpo (Ejemplo 4), actividad ADCC (Ejemplo 5), potenciación de la muerte celular inducida por la estimulación de BCR (Ejemplo 7), efectos antiproliferativos directos de los anticuerpos (Ejemplo 8), inducción del flujo de calcio (Ejemplo 6), y actividad CDC (Ejemplo 9), y efectos antiproliferativos de los inmunocóncjugados de anticuerpo-fármaco sobre la proliferación de células de tumores sólidos *in vivo* (Ejemplo 10).

Anticuerpos monoclonales 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6

Los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento son los anticuerpos monoclonales humanos 12C5, 19A3, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6, y los anticuerpos monoclonales humanos recombinantes CD22.1, CD22.2, todos ellos aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

Los anticuerpos preferidos de la presente invención son los anticuerpos monoclonales humanos 19A3, CD22.1 y CD22.2.

Las secuencias de aminoácidos de la V_H de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 31, 32, 61, 33, 34, 81, 82 y 83, respectivamente, en donde las cadenas pesadas de 19A3 y CD22.1 son idénticas y corresponde a la SEQ ID NO:32 y la cadena pesada V_H de 21F6 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NO:82 o 83.

Las secuencias de aminoácidos de la V_L de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs:35, 36, 37, 38, 39, 40, 84, 85 y 86, respectivamente, en la que las cadenas ligeras kappa de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas y corresponden a la SEQ ID NO:36, la cadena ligera kappa de 16F7 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NO:37 o 38, la cadena ligera kappa de 23C6 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NO:39 o 40, y la cadena ligera kappa de 4G6 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NO: 84 o 85.

Dado que cualquiera de estos anticuerpos puede unirse a CD22, las secuencias de V_H y V_L se pueden "mezclar y emparejar" para crear otras moléculas de unión a CD22. La unión a CD22 de dichos anticuerpos "mezclados y emparejados" se pueden analizar usando los ensayos de unión anteriormente descritos y en los Ejemplos (por ejemplo ELISA o citometría de flujo). Preferentemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y se emparejan, una secuencia V_H de un emparejamiento V_H/V_L concreto se sustituye por una secuencia V_H estructuralmente similar. Asimismo, preferentemente, una secuencia V_L de un emparejamiento V_H/V_L concreto se sustituye por una secuencia V_L estructuralmente similar.

Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22 humana, que comprende: una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 o 61 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36. En otro aspecto, los anticuerpos comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de las cadenas ligera y pesada de 19A3, CD22.1 o CD22.2.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 1-4 y 63-65, respectivamente (en las que las CDR1 de las secuencias V_H de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas y se muestran en las SEQ ID NO:2, y las CDR1 de las secuencias V_{H1} y V_{H2} de 21F6 son idénticas y se muestran en las SEQ ID NOs: 64 y 65, respectivamente).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 12C5, 19A3, CD22.1, 16F7, 23C6, CD22.2, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 5-8, 60, y 66-68, respectivamente (en las que las CDR2 de las secuencias V_H de 19A3 y CD22.1 son idénticas y se muestran en las SEQ ID NO:6, la CDR2 de la secuencia V_H de CD22.2 se muestra en la SEQ ID NO:60, y las CDR2s de las secuencias V_{H1} y V_{H2} de 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs:67 y 68).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 9-12 y 69-71, respectivamente (en las que las CDR3 de las secuencias V_H de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas y se muestran en la SEQ ID NO:10, y las CDR3 de las secuencias V_{H1} y V_{H2} de 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs:70 y 71).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_L de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 13-18 y 72-74, respectivamente (en las que las CDR1 de las secuencias V_K de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas, y se muestran en la SEQ ID NO:14, las CDR1 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 16F7 se muestran en las SEQ ID NOs: 15 y 16, las CDR1 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 23C6 se muestran en las SEQ ID NOs: 17 y 18, y las CDR1 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 4G6 se muestran en las SEQ ID NOs 72 y 73).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_L de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 19-24 y 75-77, respectivamente (en las que las CDR2 de las secuencias V_K de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas, y se muestran en la SEQ ID NO:20, las CDR2 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 16F7 se muestran en las SEQ ID NOs: 21 y 22, las CDR2 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 23C6 se muestran en las SEQ ID NOs: 23 y 24, y las CDR2 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 4G6 se muestran en las SEQ ID NOs: 75 y 76).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_L de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 25-30 y 78-80, respectivamente (en las que las CDR3 de las secuencias V_K de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas, y se muestran en la SEQ ID NO:26, las CDR3 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 16F7 se muestran en las SEQ ID NOs: 27 y 28, las CDR3 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 23C6 se muestran en las SEQ ID NOs: 29 y 30, y las CDR3 de las secuencias V_{K1} y V_{K2} de 4G6 se muestran en las SEQ ID NOs: 78 y 79).

Las regiones CDR están delineadas mediante el sistema Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a CD22 y que la especificidad de unión al anticuerpo se proporciona principalmente mediante las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L se pueden "mezclar y emparejar" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y una CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L) para crear otras moléculas de unión a CD22. La unión a CD22 de estos anticuerpos "mezclados y emparejados" se puede estudiar mediante los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, análisis ELISA, Biacore®). Preferentemente, cuando las secuencias CDR de V_H se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H concreta se sustituye por una o varias secuencias de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias CDR de V_L se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H concreta preferentemente se sustituye por una o varias secuencias de CDR estructuralmente similares. Será muy evidente para una persona normalmente experta en la técnica que se pueden crear novedosas secuencias para V_H y V_L sustituyendo una o más secuencias de una región CDR de V_H y/o V_L por secuencias estructuralmente similares procedentes de secuencias CDR divulgadas en el presente documento para las CDR1 de anticuerpo de los anticuerpos monoclonales de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6.

Por consiguiente, el anticuerpo monoclonal aislado de la invención, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO:2;
- (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende las SEQ ID NO:6 o 60;
- (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO:10;
- (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO:14;
- (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO:20; y
- (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO:26.

Es bien conocido en la materia que el dominio CDR3, independientemente de los dominio(s) CDR1 y/o CDR2, en solitario, puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno homólogo y que se pueden generar de forma predecible múltiples anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión basándose en la secuencia de CDR3 común. Véanse, por ejemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* **83**(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo humanizado dirigido contra CD30 usando solamente el dominio variable CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo murino dirigido contra CD30, Ki-4); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* **296**:833-849 (2000) (que describe anticuerpos de la glicoproteína epitelial 2 (EGP-2) recombinante usando solamente la secuencia de CDR3 del anticuerpo murino precursor MOC-31 dirigido contra EGP-2); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos dirigidos contra integrina $\alpha_v\beta_3$ humanizados que usan un dominio variable CDR3 de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo dirigido contra integrina $\alpha_v\beta_3$ de murino, LM609 en el que cada anticuerpo miembro comprende una secuencia diferente fuera del dominio CDR3 y capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo murino precursor con afinidades tan altas o más altas que el anticuerpo murino precursor); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **116**:2161-2162 (1994) (que divulga que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a unión con el antígeno); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:2529-2533 (1995) (que describe el injerto de las secuencias de CDR3 de la cadena pesada de tres Fabs (SI-1, SI-40, y SI-32) contra ADN placentario humano sobre la cadena pesada de un Fab del toxoide contra la toxina tetánica que sustituye el CDR3 de cadena pesada existente y que demuestran que el dominio CDR3 en solitario confiere especificidad de unión); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* **157**:739-749 (1996) (que describe estudios de injerto en los que la transferencia de solamente la CDR3 de la cadena pesada de un Fab poliespecífico precursor, LNA3, a una cadena pesada de un Fab p313 de un anticuerpo IgG mono-específico de unión al toxoide tetánico era suficiente para retener la especificidad de unión del Fab precursor); Berezov *et al.*, *BLA Journal* **8**:Scientific Review 8 (2001) (que describe miméticos peptídicos basados en la CDR3 de un anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2; Igarashi *et al.*, *J. Biochem (Tokyo)* **117**:452-7 (1995) (que describe un polipéptido sintético de 12 aminoácidos correspondientes al dominio CDR3 de un anticuerpo dirigido contra fosfatidilserina); Bourgeois *et al.*, *J. Virol* **72**:807-10 (1998) (que muestra que un único péptido derivado del dominio CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo dirigido contra el virus sincitial respiratorio (RSU) era capaz de neutralizar el virus *in vitro*); Levi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:4374-8 (1993) (que describe un péptido basado en el dominio CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo dirigido contra VIH murino); Polymenis y Stoller, *J. Immunol.* **152**:5218-5329 (1994) (que describe cómo se posibilita la unión de un scFv mediante el injerto de la región CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo de unión a Z-ADN) y Xu y Davis, *Immunity* **13**:37-45 (2000) (que describe que la diversidad de la CDR3 de la cadena pesada es suficiente para permitir que moléculas de IgM por otra parte idénticas distingan entre varios haptenos y antígenos proteicos). Véanse también, las patentes de Estados Unidos números 6.951.646; 6.914.128; 6.090.382; 6.818.216; 6.156.313; 6.827.925; 5.833.943; 5.762.905 y 5.760.185, que describen anticuerpos patentados definidos mediante un único dominio CDR.

Entre otros aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más

dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera procedente de un anticuerpo humano, tales como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido a partir de un animal no humano, en el que el anticuerpo puede unirse específicamente a CD22 humana. Entre otros aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera procedente de un primer anticuerpo humano, tales como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido a partir de un animal no humano, en el que el primer anticuerpo humano puede unirse específicamente a CD22 y en el que el dominio CDR3 procedente del primer anticuerpo humano sustituye un dominio CDR3 de un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión a CD22 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a CD22. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera procedentes del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir por la unión; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una similar afinidad de unión similar a la del correspondiente primer anticuerpo humano precursor.

Anticuerpos que tienen secuencias específicas de la línea germinal

En determinadas realizaciones, se describe un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada procedente de un gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina de la línea germinal concreta y/o una región variable de la cadena ligera procedente de un gen de la cadena ligera de una inmunoglobulina de la línea germinal concreta.

Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o que se deriva de un gen de V_H 7-4.1 humano, un gen de V_H 4-34 humano, un gen de V_H 5-51 humano, o un gen de V_H 1-69 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22.

En otro ejemplo, un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen de V_L 2b2 humano, un gen de V_L 6 humano, un gen de V_L A27 humano, un gen de V_L A10, o un gen de V_L L18 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22.

En otro ejemplo más, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen de V_H 7-4.1 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_L 2b2 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22, preferentemente CD22 humana.

En otro ejemplo más, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen de V_H 4-34 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_L 6 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22, preferentemente CD22 humana.

En otro ejemplo más, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen de V_H 5-51 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_L A27 o A10 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22, preferentemente CD22 humana.

En otro ejemplo más, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen de V_H 1-69 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_L 6 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22, preferentemente CD22 humana.

En otro ejemplo más, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen de V_H 1-69 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_L A27 o L18 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD22, preferentemente CD22 humana.

Dichos anticuerpos también pueden tener una o más de las características funcionales descritas con más detalle anteriormente, tales como internalización en células CD22+, actividad ADCC contra células CD22+ y/o potenciación de la muerte celular de células Ramos inducida por la estimulación de BCR con citotoxina.

Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 7-4.1 y V_L 2b2, respectivamente, es el anticuerpo 12C5. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 4-34 y V_L 6, respectivamente, es el anticuerpo 19A3. Otro ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 4-34 y V_L 6, respectivamente, es el anticuerpo CD22.1. Otro ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 4-34 y V_L 6, respectivamente, en el que la cadena V_H incluye una mutación N57Q, es el anticuerpo CD22.2. Otro ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 4-34 y V_L 6 de la línea germinal, respectivamente, es el anticuerpo 21F6. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 5-51 y V_L A27 o A10, respectivamente, es el anticuerpo 16F7. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 1-69 y

V_k L6, respectivamente, es el anticuerpo 23C6. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_L de V_H 1-69 y V_k A27 o L18, respectivamente, es el anticuerpo 4G6.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "se deriva" de una secuencia específica de la línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que contiene génico de la inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribar una genoteca de inmunoglobulina humana expresada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva" de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana con la secuencia más próxima (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva" de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal específica puede contener diferencias en los aminoácidos si se compara con la secuencia de la línea germinal debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que se producen de forma natural o la introducción intencionada de una mutación dirigida a sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal de murino). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos que codifica un gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia específica de la línea germinal humana no presentará más de 10 diferencias en sus aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de línea germinal humana.

Anticuerpos homólogos

Se describe en el presente documento un anticuerpo que comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera que son homólogas de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento, y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente divulgación.

Por ejemplo, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que:

- (a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % homóloga con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS:31-34, 61 y 81-83;
- (b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS:35-40 y 84-86;
- (c) el anticuerpo se une específicamente a CD22 humana.

De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede tener una o más de las siguientes propiedades funcionales: (a) se une a CD22 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos; (b) se internaliza en células CD22+; (c) presenta actividad ADCC en células CD22+; (d) potencia la muerte celular de células Ramos inducida mediante, por ejemplo, estimulación del BCR; y/o (e) inhibe el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjuga con una citotoxina.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas a las secuencias que se han definido anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen elevada homología (es decir, 80 % o más) con las regiones V_H y V_L de las secuencias que se han definido anteriormente, se pueden obtener por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de las moléculas de ácido nucleico que codifican las SEQ ID NOS:41-44, 62, o 87-89, o las SEQ ID NOS:45-50 o 90-92, seguido por el análisis del anticuerpo codificado alterado para determinar la retención de la función (es decir, las funciones anteriormente definidas) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias

es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, (es decir, % homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ de posiciones totales $\times$ 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede llevarse a cabo con un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes siguientes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de residuo PAM 120, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)), que se ha incorporado al programa GAP del paquete informático GCG (disponible en www.gcg.com), usando bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

De manera adicional o alternativa, las secuencias de proteína de la presente invención puede usarse además como una "secuencia de interrogación" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden llevar a cabo usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden llevar a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, valor de $W = 3$ para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, son de utilidad los parámetros predeterminados de ambos programas (por ejemplo XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

Se describe además un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en el que una o más de estas secuencias de CDR comprende secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento (es decir, 19A3, CD22.1, y CD22.2), o modificaciones conservativas de los mismos, y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente divulgación. Se entiende en la técnica que pueden realizarse determinadas modificaciones conservativas en la secuencia que no eliminan la unión al antígeno. Véanse, por ejemplo, Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32:1180-8 (que describe el análisis de mutaciones en el dominio CDR3 de la cadena pesada de anticuerpos específicos de *Salmonella*); de Wildt *et al.* (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41 (que describe estudios de mutaciones en anticuerpos dirigidos contra UAI); Komissarov *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870 (que muestran que las mutaciones en la parte central de HCDR3 eliminan la afinidad o bien la disminuyen); Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12 (que describe que un único cambio de aminoácidos en la región CDR3 elimina la actividad de unión); Kelley y O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35 (que describe la contribución de restos Tyr en la unión al antígeno); Adib-Conquy *et al.* (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 (que describe el efecto de la hidrofobicidad en la unión) y Beers *et al.* (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43 (que describe aminoácidos mutantes en HCDR3).

Por consiguiente, el anticuerpo monoclonal aislado descrito, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en el que:

- (a) la secuencia de la región variable CDR3 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 9-12, 69-71 y modificaciones conservativas de la misma;
- (b) la secuencia de la región variable CDR3 de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 25-30, 79-80, y modificaciones conservativas de la misma; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a CD22 humana.

De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede tener una o más de las siguientes propiedades funcionales: (a) se une a CD22 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos; (b) se internaliza en células CD22+; (c) presenta actividad ADCC en células CD22+; y/o (d) potencia la muerte celular de células Ramos inducida mediante estimulación del BCR; y/o (e) inhibe el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjuga con una citotoxina.

En una realización preferida, la secuencia de la región variable CDR2 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 5-8, 60, 66-68, y modificaciones conservativas de la misma; y la secuencia de la región variable CDR2 de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias

de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 19-24, 75-77, y modificaciones conservativas de la misma. En otra realización preferida, la secuencia de la región variable CDR1 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-4, 63-65, y modificaciones conservativas de la misma; y la secuencia de la región variable CDR1 de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 13-18, 72-74, y modificaciones conservativas de la misma.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión " modificaciones conservativas de la secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de presente invención mediante técnicas normalizadas conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena secundaria similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas secundarias básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas secundarias polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas secundarias no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas secundarias beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la presente divulgación se pueden sustituir con otros restos de aminoácido de la misma familia de cadenas secundarias y el anticuerpo alterado se puede analizar para comprobar que se ha retenido la función (es decir, las funciones anteriormente definidas) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos dirigidos contra CD22

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo de la CD22 humana que reconoce cualesquiera de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD22 de la presente divulgación (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir de forma cruzada para la unión con CD22 con cualesquier otros anticuerpos monoclonales de la presente divulgación). Preferentemente, el anticuerpo de referencia para los estudios de competición cruzada pueden ser el anticuerpo monoclonal 19A3 o el anticuerpo monoclonal CD22.1 o el anticuerpo monoclonal CD22.2 (que tiene las secuencias V_H y V_L que se muestran en las SEQ ID NOs: 32/61 y 36, respectivamente).

Dichos anticuerpos que compiten de forma cruzada se pueden identificar basándose en su capacidad para competir de forma cruzada con 19A3, CD22.1 y CD22.2 en un ensayo de unión a CD22 convencional. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo ELISA normalizado en el que CD22 recombinante se inmoviliza sobre la placa, uno de los anticuerpos se marca de forma fluorescente, y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no marcados para desplazar por competición el anticuerpo marcado. De manera adicional o alternativa, se pueden utilizar el análisis BIAcore para evaluar la capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada, como se describe en el Ejemplo 3, (con respecto al agrupamiento del epítipo de 19A3, CD22.1 y CD22.2). La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de, por ejemplo, 19A3, CD22.1 y CD22.2 a la CD22 humana demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con 19A3, CD22.1 y CD22.2 por la unión a CD22 humana y, por tanto, se une al mismo epítipo de la CD22 humana que el que reconocen 19A3, CD22.1 y CD22.2. Tal como se describe en detalle en el Ejemplo 3, los anticuerpos 19A3, CD22.1 y CD22.2, se unen, cada uno de ellos, a un epítipo diferente de CD22 y por tanto pertenecen a grupos de epítipo diferentes. El anticuerpo que se une al mismo epítipo en 19A3, CD22.1 y CD22.2 es un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en los Ejemplos.

Anticuerpos genomanipulados y modificados

Un anticuerpo de la presente divulgación se puede preparar además usando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de V_H y/o V_L divulgadas en el presente documento como material de partida para genomanipular un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede genomanipular modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones marco. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo se puede genomanipular modificando los restos de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

En determinadas realizaciones, el injerto de la CDR se puede usar para genomanipular regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y la

cadena ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural injertadas en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* M: 10029-10033; la patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos con números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*)

Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias CDR de V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 19A3, CD22.1 y CD22.2, aunque pueden contener secuencias marco diferentes a las de dichos anticuerpos.

Dichas secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen las secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N.º 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germline V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836. Como ejemplo adicional, se pueden encontrar las secuencias de ADN de la línea germinal de los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la línea germinal de la cadena pesada que se encuentran en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles con los números de registro del Genbank adjuntos: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). Como ejemplo adicional, las siguientes secuencias de la línea germinal de la cadena pesada que se encuentran en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles con los números de registro del Genbank adjuntos: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NG0010109 y NT_024637), 4-34 (NG_0010109 y NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias proteicas del anticuerpo se comparan con una base de datos compilada de secuencias de proteína usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia denominado Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), que es bien conocido de los expertos en la materia. BLAST es un algoritmo heurístico en el que un alineamiento estadísticamente significativo entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la base de datos probablemente contiene pares de segmentos de alta puntuación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyas puntuaciones no se pueden mejorar por extensión o recorte se denominan un *hallazgo*. Brevemente, las secuencias de nucleótidos con origen en VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) se traducen, y la región comprendida y que incluye la región marco de la FR1 a la FR3 se retiene. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud promedio de 98 restos. Las secuencias duplicadas que sean emparejamientos exactos para la totalidad de la longitud de la proteína se eliminan. Una búsqueda BLAST de proteínas mediante el programa blastp con los parámetros convencionales preconfigurados, salvo el filtro de baja complejidad, que se desactiva, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra los 5 hallazgos principales, proporcionando emparejamientos de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen para los seis marcos y el marco que no tiene codones de terminación en el segmento emparejado de la secuencia de la base de datos se considera el hallazgo potencial. A su vez, esto se confirma usando el programa de BLAST tblastx, que traduce la secuencia del anticuerpo para los seis marcos y compara dichas traducciones con las secuencias de nucleótidos de VBASE traducidas de forma dinámica para los seis marcos.

Las identidades son correspondencias de aminoácidos exactas entre la secuencia del anticuerpo y la base de datos de proteínas para la longitud completa de la secuencia. Los positivos (identidades + emparejamiento con sustitución) no son idénticos, sino que tiene sustituciones de aminoácidos guiadas mediante la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia del anticuerpo se corresponde con dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, el hallazgo con más positivos se considerará el hallazgo de la secuencia correspondiente.

Las secuencias marco preferidas para su uso con los anticuerpos de la presente divulgación son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por los anticuerpos seleccionados de la presente divulgación, *por ejemplo*, similar a la secuencia marco de V_H 4-34 (SEQ ID NO:52) y/o la secuencia marco de V_K L6 (SEQ ID NO:56) usada por los anticuerpos monoclonales preferidos de la presente divulgación. Las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V_K, se pueden injertar en regiones marco que tienen una secuencia idéntica a la encontrada para el gen de inmunoglobulina de la línea germinal de la que deriva la secuencia marco, o las secuencias de las CDR se pueden injertar en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que, en determinados casos, es beneficioso mutar restos dentro de las regiones marco para conservar o potenciar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de la región variable es la mutación de restos de aminoácidos en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida a sitio o la mutagénesis mediada por PCR se pueden realizar para introducir la(s) mutación(es), y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. Se introducen modificaciones preferentemente conservativas (como se ha descrito anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero preferentemente son sustituciones. Además, normalmente, no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región CDR.

Por consiguiente, se describen anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD22 aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región variable CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-4 o 63-65, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 1-4 o 63-65; (b) una región variable CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 5-8, 60 o 66-68, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 5-8, 60 o 66-68; (c) una región variable CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 9-12 o 69-71, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 9-12 o 69-71; (d) una región variable CDR1 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13-18 o 72-74, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 13-18 o 72-74; (e) una región variable CDR2 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 19-24 o 75-77, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 19-24 o 75-77; y (f) una región variable CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 25-30 o 78-80, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 25-30 o 78-80.

Los anticuerpos genomanipulados de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en los restos de la región marco de V_H y/o V_L , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, dichas modificaciones de la región marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la región marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener restos de la región marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales restos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que proviene el anticuerpo.

Por ejemplo, para la región 12C5 de V_A , las posiciones de aminoácidos 40 y 68 de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Una o ambas de estas posiciones se pueden retromutar a las secuencias de la línea germinal haciendo una o ambas de las siguientes sustituciones: L40Q y R68K.

Además, para las regiones 19A3 y CD22.1 de V_H , la posición de aminoácido 27 de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difiere de la línea germinal. Esta posición se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo la siguiente sustitución: R27G,

Además, para la región CD22.2 de V_H , las posiciones de aminoácidos 27 y 57 de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Esta posición se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo las siguientes sustituciones: R27G y Q57N.

Además, para la región 16F7 de V_H , la posición de aminoácido 28 de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difiere de la línea germinal. Esta posición se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo la siguiente sustitución: N28S.

Además, para la región 16F7 de $V_{\kappa 2}$, la posición de aminoácido 85 de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difiere de la línea germinal. Esta posición se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo la siguiente sustitución: A85T.

Además, para la región 23C6 de V_H , las posiciones de aminoácidos 14, 79 y 88 de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Una, dos o las tres posiciones se pueden retromutar a las secuencias de la línea germinal realizando una, dos o las tres de las siguientes sustituciones: T14P, V79A y A88S.

Además, para la región 4G6 de V_H , las posiciones de aminoácidos P, D, F, D, T, Y, y F de la región marco (usando el

sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Esta posición se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete de las siguientes sustituciones: P?A; D?G; N?S; F?Y; D?E; T?S; Y?R; F?S.

- 5 Además, para la región 4G6 de V_K1, las posiciones T y D de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Estas posiciones se pueden retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo una o dos de las siguientes sustitución: T?K y D?E.

- 10 Además, para la región 21F6 de V_H1, las posiciones de aminoácidos S e I de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Estas posiciones se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo la siguiente sustitución: S?P e I?V.

- 15 Además, para la región 21F6 de V_H2, las posiciones S y M de la región marco (usando el sistema de numeración de Kabat) difieren de la línea germinal. Estas posiciones se puede retromutar a la secuencia de la línea germinal haciendo la siguiente sustitución: S?P y M?V.

- 20 Otro tipo de modificación en la región marco implica mutar uno o más restos en la región marco o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de linfocitos T para reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2003/0153043 de Carr *et al.*

- 25 De forma adicional o alternativa a las modificaciones realizadas en la región marco o en las regiones CDR, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden genomanipular para incluir modificaciones en la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la presente divulgación se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos de la región Fc es la del índice de la UE de Kabat.

- 30 En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que se altera el número de restos cisteína en la región bisagra, *por ejemplo*, se aumenta o se disminuye. Esta estrategia se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos N.º 5.677.425 de Bodmer *et al.* El número de restos cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, *por ejemplo*, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

- 40 En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase del dominio CH₂-CH₃ del fragmento bisagra-Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada comparada con la unión a SpA de Fc-bisagra natural. Esta aproximación se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos N.º 6.165.745 de Ward y col.

- 45 En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar en la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH₂ de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.869.046 y 6.121.022 de Presta *et al.*

- 50 En otras realizaciones más, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de entre los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero mantenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, *por ejemplo*, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe en detalle en las patentes de Estados Unidos con números 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter *et al.*

- 60 En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o eliminada. Esta estrategia se describe en detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 de Idusogie *et al.*

- 65 En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para modificar de esta forma la capacidad del anticuerpo de fijarse al complemento. Esta estrategia se describe en detalle en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

En otro ejemplo más, la región Fc está modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc γ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión sobre la IgG1 humana para Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII y FcRn se han cartografiado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. *et al* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se ha demostrado que mutaciones específicas en posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a Fc γ RIII. Adicionalmente, se ha mostrado que los siguientes mutantes combinados mejoran la unión a Fc γ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización adicional, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden generar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la región marco variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos números 5.714.350 y 6.350.861 de Co *et al.* Enfoques adicionales para alterar la glicosilación se describen con mayor detalle en la patente de Estados Unidos 7.214.775 de Hanai *et al.*, la patente de Estados Unidos n.º 6.737.056 de Presta, la pub. estadounidense n.º 20070020260 de Presta, la Publicación PCT n.º WO/2007/084926 de Dickey *et al.*, la Publicación PCT n.º WO/2006/089294 de Zhu *et al.*, y la Publicación PCT n.º WO/2007/055916 de Ravetch *et al.*

En una realización ilustrativa, un sitio de glicosilación en la región CDR2 de la cadena V_H del anticuerpo 19A3 se eliminó mediante la introducción de una mutación N57Q (véase el Ejemplo 1), para proporcionar el anticuerpo recombinante CD22.2 que tiene la secuencia de aminoácidos de V_H que se muestra en la SEQ ID NO:61.

De manera adicional o alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tiene que tiene estructuras GlcNAc bisectadas en más cantidad. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterada aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la materia y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la presente divulgación para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas de células Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8^{-/-} se crearon mediante perturbación dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de sustitución (véanse la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040110704) de Yamane *et al* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como ejemplo adicional, el documento EP 1.176.195 de Hanai *et al* describe una línea de células con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea de células presentan hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace alfa-1,6. Hanai *et al* describen también líneas de células que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o que no tiene actividad enzimática, por ejemplo, la línea de células YB2/O de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea de células CHO, las células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono unidos a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en dicha célula hospedadora (véase también Shields, R.L. *et al* (2002) *J. Biol Chem.* 277:26733-26740). Pueden producirse también anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado en huevos de pollo, tal como se describe en la publicación de patente WO n.º WO 2006/089231. Como alternativa, pueden producirse anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna*. La publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al* describe líneas de células genomanipuladas para expresar glicosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo la beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que tales anticuerpos expresados en las líneas de células genomanipuladas presentan más estructuras GlcNAc bisectadas, lo que da como resultado una actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana *et al*, 1999 *Nat. Biotech.* 17: 176-180). Como alternativa, los restos fucosa del anticuerpo pueden escindirse utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina restos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. *et al* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

De manera adicional o alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterado, en el que dicha alteración está relacionada con el nivel de sialilación del anticuerpo. Dichas alteraciones se describen en la Publicación PCT n.º WO/2007/084926 de Dickey *et al*, y en la Publicación PCT n.º WO/2007/055916 de Ravetch *et al*. Por ejemplo, se puede emplear una reacción enzimática con sialidasa, tales como, por ejemplo, sialidasa de

Arthrobacter ureafacens. Las condiciones de dicha reacción se describen de una forma general en la patente de Estados Unidos n.º 5.831.077. Otros ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas son la neuraminidasa y la N-Glicosidasa F, como se describe en Schloemer *et al.*, J. Virology, 15(4), 882-893 (1975) y en Leibiger *et al.*, Biochem J., 338, 529-538 (1999), respectivamente. Los anticuerpos desialados se pueden purificar adicionalmente mediante cromatografía de afinidad. Como alternativa, se pueden emplear métodos para aumentar el nivel de sialilación, tal como mediante el uso de enzimas sialiltransferasas. Las condiciones de dicha reacción se describen de una forma general en Basset *et al.*, Scandinavian Journal of Immunology, 51(3), 307-311 (2000).

Otra modificación de los anticuerpos del presente documento que se contempla en la presente divulgación es la pegilación. Se puede pegar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar normalmente con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG quedan unidos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi (C₁-C₁₀) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente divulgación. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura *et al* y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa *et al*.

Fragmentos de anticuerpo y miméticos de anticuerpo

La presente invención no se limita a anticuerpos tradicionales y se puede llevar a la práctica mediante el uso de fragmentos de anticuerpo. Como se detalla a continuación, actualmente se ha desarrollado una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpo y son ampliamente conocidas en la materia. Aunque numerosas de estas tecnologías, tales como anticuerpos de dominio, nanocuerpos, y unicuerpos, utilizan fragmentos, u otras modificaciones de, estructuras de anticuerpos tradicionales, también existen tecnologías alternativas, tales como aficuerpos, DARPs, anticalinas, avímeros, y versacuerpos que utilizan estructuras de unión que, aunque imitan la unión de los anticuerpos tradicionales, se generan a partir de, y funcionan, por mecanismos diferentes.

Los anticuerpos de dominio (dAb) son las unidades de unión funcionales más pequeñas de anticuerpos, que se corresponden con las regiones variables de cualquiera de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y muy funcionales de dAb de VH y VL humanos (más de diez millones de secuencias diferentes en cada biblioteca) y usa estas bibliotecas para seleccionar los dAb que son específicos para dianas terapéuticas. Al contrario de muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas bacterianos, de levaduras y de células de mamífero. Los detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y los métodos de producción de los mismos se pueden obtener como referencia en las patentes de Estados Unidos 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; el documento de Estados Unidos con N.º de serie 2004/0110941; la solicitud de patente europea n.º 1433846 y las patentes europeas 0368684 y 0616640; los documentos WO05/035572, W004/101790, W004/081026, W004/058821, W004/003019 y W003/002609.

Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante destacar que, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y se pueden humanizar de manera adicional sin ninguna pérdida de actividad. Es importante destacar que, los nanocuerpos tienen bajo potencial inmunogénico, lo que se ha confirmado en estudios realizados en primates con compuestos que llevan nanocuerpos.

Los nanocuerpos combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de los fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los nanocuerpos presentan una alta especificidad con la diana, una alta afinidad por su diana y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de molécula pequeña, pueden inhibir enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras del receptor. Además, los nanocuerpos son extremadamente estables, se pueden administrar por medios diferentes a una inyección (véase, por ejemplo, el documento WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítopos no comunes o escondidos como resultado de su pequeño tamaño, la unión a cavidades o sitios activos de dianas proteicas con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad tridimensional única de formato de fármaco, el ajuste de la vida media y la facilidad y velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los nanocuerpos se codifican por genes únicos y se producen de manera eficaz en casi todos los hospedadores

procariotas y eucariotas, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, el documento 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo, el documento U.S. 6.838.254). El proceso de producción es escalable y se han producido nanocuerpos en cantidades de varios kilogramos. Dado que los nanocuerpos presentan una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, se pueden formular como una solución de larga vida útil y fácil de usar.

El método del nanoclón (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar nanocuerpos contra una diana deseada, basado en una selección automatizada de linfocitos B de alto rendimiento.

Los unicuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpo, sin embargo, esta se basa en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La delección de la región bisagra da como resultado una molécula que tiene prácticamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. También es bien sabido que los anticuerpos IgG4 son inertes y, por lo tanto, no interaccionan con el sistema inmunitario, lo que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades donde no se desea una respuesta inmunitaria, y esta ventaja se consigue con los unicuerpos. Por ejemplo, los unicuerpos pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no eliminar, las células a las que se unen. Adicionalmente, la unión de los unicuerpos a células cancerosas no estimula su proliferación. Además, dado que los unicuerpos tienen aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden presentar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los unicuerpos se eliminan del cuerpo a una tasa similar a la de los anticuerpos IgG4 completos y son capaces de unirse con una afinidad por sus antígenos similar a la de los anticuerpos completos. Los detalles adicionales de los unicuerpos se pueden obtener con referencia a la solicitud de patente WO2007/059782.

Las moléculas de aficuerpos representan una nueva clase de proteínas de afinidad basada en un dominio de proteína con 58 restos de aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína estafilocócica A. Este dominio en forma de haz de tres hélices se ha usado como estructura principal para la construcción de bibliotecas combinatorias de fagémidos, a partir de la cual se pueden seleccionar variantes de aficuerpos que se dirigen a las moléculas deseadas usando tecnología de expresión en fago (Nord K, Gunncriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002;269:2647-55). La sencilla y sólida estructura de las moléculas de aficuerpos junto con su bajo peso molecular (6 kDa) las convierte en adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002;261:199-211) y para inhibir las interacciones con el receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003;16:691-7). Los detalles adicionales de los aficuerpos y los métodos de producción de los mismos se pueden obtener como referencia en las patentes de Estados Unidos 5.831.012.

Los anticuerpos marcados también pueden ser de utilidad en aplicaciones de obtención de imágenes para determinar la abundancia de las isoformas.

Las DARPIn (proteínas diseñadas con repeticiones de anquirina) son un ejemplo de la tecnología de un mimético de anticuerpo DRP (proteínas diseñadas con repeticiones) que se ha desarrollado para aprovechar las capacidades de unión de polipéptidos no de anticuerpos. Las proteínas con repeticiones tales como las proteínas con repeticiones ricas en anquirina o leucina, son moléculas de unión ubicuas, que aparecen, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales de repetición (repeticiones), que se apilan entre sí para formar dominios de repetición alargados que presentan superficies de unión a la diana variables y modulares. Basándose en esta modularidad, se pueden generar bibliotecas combinatorias de polipéptidos con gran cantidad de especificidades de unión. Esta estrategia incluye el diseño de consenso de repeticiones autocompatibles que presentan restos variables en la superficie y su ensamblaje aleatorio en dominios de repetición.

Las DARPIn se pueden producir en sistemas de expresión bacterianos con rendimientos muy altos y se trata de las proteínas más estables conocidas. Se han seleccionado DARPIn muy específicas de alta afinidad para una amplia gama de proteínas diana, incluidos receptores humanos, proteasas humanas, virus, y proteínas de membrana. Se pueden obtener DARPIn con afinidades en el intervalo nanomolar a picomolar de un solo dígito.

Las DARPIn se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones, incluidas ELISA, ELISA en sándwich, análisis mediante citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones en obleas, purificación por afinidad o transferencia Western. También se ha demostrado que las DARPIn son muy activas en el compartimento intracelular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas con la proteína fluorescente verde (GFP). Las DARPIn se han utilizado adicionalmente para evitar la entrada vírica con valores de CI50 en el intervalo pM. Las DARPIn no solo son ideales para bloquear las interacciones proteína-proteína, sino también para inhibir enzimas. Las proteasas, kinasa y vehículos se han inhibido con éxito, muy frecuentemente en el modo de inhibición

alostérico. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos sobre el tumor y relaciones muy favorables de tumor a sangre convierten las DARPin en muy adecuadas para el diagnóstico in vivo o para enfoques terapéuticos.

Se puede encontrar información adicional relativa a las DARPin y otras tecnologías DRP se pueden encontrar en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2004/0132028 y en la publicación de solicitud de patente de internacional n.º WO 02/20565.

Las anticalinas son una tecnología de miméticos de anticuerpo adicional, sin embargo, en este caso, la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan de forma natural y abundantemente en los tejidos humanos y fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para realizar una gama de funciones in vivo asociadas con el transporte y almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca sólida que comprende un cilindro β muy conservado que soporta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles forman la entrada a un bolsillo de unión y proporcionan diferencias conformacionales en esta parte de la molécula que suponen la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

Aunque la estructura global de los bucles hipervariables soportados por una estructura en β -lámina conservada es una reminiscencia de las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren notablemente de los anticuerpos en cuestión de tamaño, estando compuestas por una única cadena polipeptídica de 160-180 aminoácidos que marginalmente es más grande que un único dominios de inmunoglobulina.

Las lipocalinas se clonan, y sus bucles están sometidos a genomanipulación para crear anticalinas. Se han generado bibliotecas de anticalinas estructuralmente diferentes, y la expresión de anticalinas permite la selección y cribado de la función de unión, seguido de la expresión y producción de proteínas solubles para su análisis adicional en sistemas procariotas o eucariotas. Los estudios han demostrado con éxito que se pueden desarrollar anticalinas que sean específicas de prácticamente cualquier proteína diana humana que se pueda aislar, y se pueden obtener afinidades de unión en el intervalo nanomolar o superior.

Las anticalinas también se pueden formular como proteínas de diana doble, las denominadas duocalinas. Una duocalina se une a dos dianas terapéuticas diferentes en una proteína monomérica de producción sencilla usando procesos de fabricación convencionales que retienen la especificidad y la afinidad por la diana independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de múltiples dianas mediante una sola molécula es especialmente ventajoso en enfermedades conocidas por implicar más de un único factor causante. Además, los formatos de unión bivalente o multivalente tales como las duocalinas tienen un potencial significativo en el direccionamiento de moléculas de la superficie celular en una enfermedad, mediando efectos agonistas sobre las rutas de transducción de la señal o induciendo efectos de internalización mediante la unión y agrupación de los receptores de la superficie celular. Además, la elevada estabilidad intrínseca de las duocalinas es comparable a la de las anticalinas monoméricas, ofreciendo una formulación flexible y potencial de administración para las duocalinas.

Se puede encontrar información adicional relativa a las anticalinas en la patente de Estados Unidos N.º 7.250.297 y en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/16873.

Otra tecnología de miméticos de anticuerpo son los avímeros. Los avímeros han evolucionado a partir de una importante familia de dominios de receptores extracelulares humanos mediante reordenamiento de axones in vivo y expresión in fago, generando proteínas multidominio con propiedades inhibitorias y unión. Se ha demostrado que la unión de múltiples dominios de unión independientes crean avidéz y dan como resultado una afinidad y especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión de un solo epítipo convencionales. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficaz de moléculas específicas multidiana en *Escherichia coli*, una termoestabilidad y resistencia a las proteasas mejorada. Se han obtenido avímeros con afinidades submoleculares contra una gran variedad de dianas.

Se puede encontrar información adicional sobre los avímeros en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos con números 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

Los versacuerpos son otra tecnología de miméticos de anticuerpo que se podría utilizar. Los versacuerpos son proteínas pequeñas de 3-5 kDa con >15 % de cisteínas, que forman una estructura de disulfuro de alta densidad, sustituyendo el núcleo hidrófobo que tienen las proteínas típicas. La sustitución de una gran cantidad de aminoácidos hidrófobos, que comprenden el núcleo hidrófobo, por una pequeña cantidad de disulfuros da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrófila (menos agregación y unión no específica), más resistente a las proteasas y al calor, y tiene una menor densidad de epítopos de linfocitos T, puesto que los restos que más contribuyen al complejo de presentación MHC son hidrófobos. Es bien sabido que estas cuatro propiedades afectan la inmunogenicidad, y conjuntamente, se espera que produzcan una importante disminución en la inmunogenicidad.

La inspiración de los versacuerpos procede de las sustancias biofarmacéuticas inyectables de origen natural producidas por sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que se sabe que presentan una inmunogenicidad inesperadamente baja. A partir de familias de proteínas naturales seleccionadas, mediante el diseño y cribado por tamaño, hidrofobicidad, procesamiento proteolítico de antígenos, y densidad de epítomos, se minimizan hasta niveles bien por debajo del promedio para las proteínas inyectables naturales.

Dada la estructura de los versacuerpos, estos miméticos de anticuerpo ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, multiespecificidad, diversos mecanismos de semivida, módulos de direccionamiento del tejido, y ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los versacuerpos se fabrican en *E. coli* con altos rendimientos, y debido a su hidrofiliidad y pequeño tamaño, los versacuerpos son muy solubles y se pueden formular en elevadas concentraciones. Los versacuerpos son excepcionalmente estables frente al calor (se pueden hervir) y ofrecen una duración prolongada.

Se puede encontrar información adicional sobre los versacuerpos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0191272.

La descripción detallada de las tecnologías de fragmentos de anticuerpos y de miméticos de anticuerpo que se ha proporcionado anteriormente no pretende ser una lista exhaustiva de todas las tecnologías que podrían utilizarse en el contexto del presente memoria descriptiva. Por ejemplo, y no de forma excluyente, tampoco, se podría utilizar varias tecnologías adicionales incluidas tecnologías alternativas basadas en polipéptidos, tales como las fusiones de regiones determinantes del complemento como se reseña en Qui et al., *Nature Biotechnology*, 25(8) 921-929 (2007), así como tecnologías basadas en ácidos nucleicos, tales como tecnologías de aptámeros de ARN como las descritas en las patentes de Estados Unidos números 5.789.157, 5.864.026, 5.712.375, 5.763.566, 6.013.443, 6.376.474, 6.613.526, 6.114.120, 6.261.774, y 6.387.620.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden caracterizar adicionalmente por las diferentes propiedades físicas de los anticuerpos dirigidos contra CD22. Se pueden usar diferentes ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener uno o más sitios de glicosilación en la región variable de la cadena ligera o bien de la cadena pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede dar como resultado un aumento en la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pH del anticuerpo debido a la alteración de la unión con el antígeno (Marshall et al (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick et al (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se sabe que la glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación de la región variable se puede analizar utilizando un ensayo Glycoblot, que escinde el anticuerpo para producir un Fab, y a continuación ensaya la glicosilación usando un ensayo que mide la oxidación del peryodato y la formación de base de Schiff. Como alternativa, la glicosilación de la región variable se puede analizar usando cromatografía ligera Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido de sacáridos individuales. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo dirigido contra CD22 que no contiene glicosilación de la región variable. Esto se puede conseguir bien seleccionando anticuerpos que no contienen motivos de glicosilación en la región variable o haciendo mutar restos dentro del motivo de glicosilación usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente divulgación no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Se puede producir un efecto de desamidación o ácido isoaspártico en secuencias N-G o D-G, respectivamente. Los efectos de desamidación o ácido isoaspártico dan como resultado la creación de ácido isoaspártico, que disminuye la estabilidad de un anticuerpo por creación de una estructura retorcida en el extremo carboxi de una cadena secundaria en lugar de en la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico se puede medir mediante un ensayo iso-quant, que utiliza una HPLC en fase invertida para analizar el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un único punto isoeléctrico (pI), aunque generalmente los anticuerpos estarán comprendidos en un intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI de un anticuerpo IgG1 se encuentra normalmente en el intervalo de pH de 7-9,5, y el pI de un anticuerpo IgG4 se encuentra normalmente en el intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI no comprendido en dicho intervalo. Aunque los efectos son generalmente desconocidos, hay especulaciones de que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener cierto replegado e inestabilidad en condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico se puede analizar usando un ensayo de centrado isoeléctrico capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar enfoque por láser para aumentar la precisión (Janini et al (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma et al. (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt et al (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo dirigido contra CD22 que contenga un valor de pI que se encuentre comprendido en el intervalo normal. Esto se puede conseguir bien seleccionando anticuerpos con un valor de pI en el intervalo normal, o por mutación de restos con superficie cargada usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Una estabilidad térmica mayor indica mayor estabilidad global del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando técnicas tales como calorimetría de barrido diferencial (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T_{M1} indica la temperatura de desplegamiento inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del desplegamiento completo del anticuerpo. En general, se prefiere que la T_{M1} de un anticuerpo de la presente divulgación sea mayor de 60°C, preferentemente mayor de 65°C, incluso más preferentemente mayor de 70°C. De forma alternativa, la estabilidad térmica de un anticuerpo se puede medir usando difracción circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una realización preferida, se seleccionan los anticuerpos para que no se degraden rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo dirigido contra CD22 se puede medir por electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como es bien sabido en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra realización preferida, los anticuerpos se seleccionan para que tengan efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir a la estimulación de una respuesta inmunitaria indeseada y/o alterada o a propiedades farmacocinéticas desfavorables. En general, son aceptables anticuerpos con una agregación del 25 % o menos, preferentemente del 20 % o menos, incluso más preferentemente del 15 % o menos, incluso más preferentemente del 10 % o menos e incluso más preferentemente del 5 % o menos. La agregación se puede medir por diferentes técnicas bien conocidas en la materia, incluida la columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y dispersión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Métodos para genomanipular anticuerpos

Como se analiza anteriormente, los anticuerpos dirigidos contra CD22 cuyas secuencias de V_H y V_L se divulgan en el presente documento se pueden usar para crear nuevos anticuerpos dirigidos contra CD22 modificando las secuencias de V_H y/o V_L , o una o más regiones constantes unidas a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto, los rasgos estructurales del anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención, es decir, 19A3, CD22.1 y CD22.2, se utilizan para crear anticuerpos dirigidos contra CD22 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la presente invención, tal como la unión a CD22 humana. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 19A3, CD22.1 y CD22.2, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco y/u otras CDR para crear anticuerpos dirigidos contra CD22 adicionales genomanipulados de forma recombinante, como se ha analizado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en el apartado anterior. El material de partida para el método de genomanipulación es una o más de las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en el presente documento. Para crear el anticuerpo genomanipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresarlo como proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en una o más secuencias se utiliza como material de partida para crear una o varias secuencias de "segunda generación" derivadas de la una o varias secuencias originales y, a continuación, la una o varias secuencias de "segunda generación" se expresa como proteína.

Por consiguiente, en otra realización, se describe un método para preparar un anticuerpo dirigido contra CD22 que comprende:

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4 y 63-65; (a) una secuencia CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 5-8, 60, y 66-68 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 9-12 y 69-71; y/o (ii) una secuencia de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo que comprende una secuencia a CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 13-18 y 72-74; (a) una secuencia CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 19-24 y 75-77; y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 25-30 y 78-80;
- (b) alterar al menos un resto de aminoácido dentro de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo para crear al menos una secuencia alterada del anticuerpo; y
- (c) expresar la secuencia alterada del anticuerpo como una proteína.

Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de biología molecular convencionales para preparar y expresar la secuencia alterada del anticuerpo.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la una o más secuencia alterada del anticuerpo es uno que retiene una, parte o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos dirigido contra CD22 descritos en el presente documento, donde las propiedades funcionales incluyen, aunque no de forma limitativa:

- (a) se internalizan en células CD22+;
- (b) presentan actividad ADCC en células CD22+;

- (c) potencian la muerte celular de células Ramos inducida mediante estimulación del BCR (BCR);
- (d) no tienen un efecto antiproliferativo directo en células Ramos;
- (d) no inducen flujo de calcio en células Ramos;
- (e) no median la actividad CDC en células Ramos; y/o
- 5 (f) inhibe el crecimiento de células que expresan CD22 *in vivo* cuando se conjugan con una citotoxina

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar mediante ensayos normalizados disponibles en la materia y/o descritos en el presente documento, tales como los definidas en los Ejemplos.

- 10 En determinadas realizaciones de los métodos de anticuerpos genomanipulados de la presente divulgación, se pueden introducir mutaciones de forma aleatoria o selectiva a lo largo todo o parte de la secuencia que codifica un anticuerpo dirigido contra CD22 y los anticuerpos dirigidos contra CD22 modificados resultantes se pueden cribar para determinar la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en el presente documento. Se han descrito en la técnica métodos mutacionales. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short
- 15 describe métodos para crear y cribar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis por saturación, ensamblaje de ligadura sintética, o una combinación de los mismos. Como alternativa, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.* describe métodos para utilizar métodos de cribado informáticos para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

20 Moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la presente invención

- Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la presente invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado de células, o en una forma parcialmente purificada o prácticamente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "convertido en
- 25 prácticamente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, *por ejemplo*, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Véanse, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede
- 30 contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

- Los ácidos nucleicos se pueden obtener usando técnicas convencionales de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que contienen génico de la inmunoglobulina humana como se describe más detalladamente a continuación), los ADNc que
- 35 codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo fabricados por el hibridoma se pueden obtener mediante amplificación PCR convencional o técnicas de clonación del ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulina (*por ejemplo*, utilizando técnicas de expresión en fago), se puede recuperar un ácido nucleico que codifica dichos anticuerpos de la genoteca.

- 40 Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la presente invención son las que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 19A3, CD22.1 y CD22.2. Las secuencias de ADN que codifican la V_H de 12C5, 19A3, CD22.1, 16F7, 23C6, CD22.2, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 41-44, 62 y 87-89, respectivamente (en la que las cadenas pesadas de 19A3 y CD22.1 son idénticas y corresponden a la SEQ ID NO:42; la cadena pesada de CD22.2 corresponde a la SEQ ID NO:62; y las cadenas pesadas de 21F6
- 45 corresponden a las SEQ ID NOs:82 y 83). Las secuencias de ADN que codifican la V_L de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7, 23C6, 4G6 y 21F6 se muestran en las SEQ ID NOs: 45-50 y 90-92, respectivamente, en las que las cadenas ligeras kappa de 19A3, CD22.1 y CD22.2 son idénticas y corresponden a la SEQ ID NO:46, la cadena ligera kappa de 16F7 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NO:47 o 48, la cadena ligera kappa de 23C6 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NO:49 o 50, y la cadena ligera kappa de 4G6 corresponde a cualquiera de
- 50 las SEQ ID NO: 90 o 91).

- Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en los genes del
- 55 fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido operablemente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

- 60 El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la materia (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación PCR
- 65

convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgQ1, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferible es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Se conocen en la técnica las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación PCR convencional. En realizaciones preferidas, la región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, *por ejemplo*, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal manera que las secuencias V_H y V_L pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* **242**:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* **348**:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se pueden producir mediante diferentes técnicas, incluida metodología convencional de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975) *Nature* **256**: 495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales (por ejemplo, la transformación vírica o mediante oncogenes de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas de aislamiento de los esplenocitos inmunizados para su fusión son conocidos en la técnica. Los ligandos de fusión (por ejemplo, células de mieloma de murino) y los procedimientos de fusión son también conocidos.

Se pueden preparar anticuerpos quiméricos o humanizados basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina se pueden obtener a partir del hibridoma no humano de interés, y genomanipularse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, regiones variables de murino se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR de murino en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (véanse la patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos con números 5.530.101; 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

En una realización preferida, los anticuerpos dirigidos de la presente invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD22 humana se pueden generar utilizando ratones transgénicos o trans cromosómicos que contienen partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y trans cromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento HuMAb Mouse[®] y KM Mouse[®], respectivamente, y se denominan conjuntamente en el presente documento "ratones Ig humanos".

El HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contiene miniloci de la inmunoglobulina humana que codifican secuencias de la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera k no reordenadas humanas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena μ y k endógenos (véase por ejemplo, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* **368**(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o I de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales humanos IgG_k de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), *citado anteriormente*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* **113**:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* **13**: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **764**:536-546). La preparación y uso del HuMAb Mouse[®], y las modificaciones genómicas que lleva dicho ratón, se describe adicionalmente en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* **20**:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* **5**: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* **4**:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* **152**:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* **6**: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851. Véanse además, las patentes de Estados Unidos números 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados

Unidos n.º 5.545.807 de Turner *et al.*; las publicaciones PCT con números WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT n.º WO 01/14424 de Korman *et al.*

En otra realización, los anticuerpos humanos de la presente divulgación se pueden sensibilizar usando un ratón que tiene secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas tal como un ratón que tiene un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Este ratón se denomina en el presente documento como un "KM mouse[®]", y se describe detalladamente en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

Adicionalmente, sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se puede utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati *et al.*

Además, sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se puede utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente divulgación. Por ejemplo, ratones que tienen tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadenas ligera humana, denominados como "ratones TC" son de utilidad; dichos ratones se describe en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que tienen transcromosomas de la cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894 y en la solicitud PCT n.º WO 2002/092812) y se puede utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente divulgación.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación también se pueden preparar usando métodos de expresión en fago para cribar genotecas de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de expresión en fago para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las patentes de Estados Unidos números 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner *et al.*; las patentes de Estados Unidos con números 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; las patentes de Estados Unidos con números 5.969.108 y 6.172.197 de *et al.*; y las patentes de Estados Unidos con números 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.*

Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación se pueden preparar también usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson *et al.*

En otra realización, los anticuerpos dirigidos contra CD22 se preparan usando una combinación de técnicas de ratón con Ig humana y técnicas de expresión en fago, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.794.132 de *et al.* De forma más específica, el método implica en primer lugar sensibilizar una respuesta de anticuerpos contra CD22 en un ratón con Ig humana (tal como un ratón HuMab o un ratón KM como se ha descrito anteriormente) por inmunización del ratón con un antígeno de CD22, seguido por aislamiento de los ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpo humano procedentes de células linfáticas de ratón, e introducción de estos ácidos nucleicos en un vector de expresión (por ejemplo, un fago) para proporcionar una biblioteca de paquetes de expresión. Por lo tanto, cada elemento de la biblioteca comprende un ácido nucleico que codifica una cadena de anticuerpo humano y cada cadena de anticuerpo se expresa a partir del paquete de expresión.

A continuación, la biblioteca se secuencian con un antígeno de CD22 para aislar los elementos de la biblioteca que se unen específicamente a CD22. A continuación se aíslan inserciones de ácido nucleico de los elementos de la biblioteca seleccionados, que se secuencian por métodos convencionales para determinar las secuencias variable de la cadena ligera y pesada de los ligandos de CD22 seleccionados. Las regiones variables se pueden convertir en cadenas de anticuerpo de longitud completa mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, tal como la clonación de las regiones variables en un vector de expresión que contiene las regiones constante de la cadena pesada y ligera humana de forma que la región V_H está operativamente unida a la región C_H y la región V_L está operativamente unida a la región C_L.

Inmunización de ratones con Ig humana

Cuando se usan ratones con Ig humana para sensibilizar los anticuerpos humanos de la presente divulgación, dichos ratones se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD22 y/o CD22 recombinante, o células que expresan CD22, o una proteína de fusión CD22, como se describe en Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y en las publicaciones PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, el ratón tendrá 6-16 semanas de edad durante la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) del antígeno CD22 para inmunizar por vía intraperitoneal los ratones con Ig humana. De la manera más preferida, el inmunógeno

utilizado para sensibilizar los anticuerpos de la presente divulgación es una combinación del dominio extracelular de CD22 recombinante humano y células CHO genomanipuladas para expresar la CD22 de longitud completa humana sobre la superficie celular (descrito más detalladamente en el Ejemplo 1).

- 5 Los procedimientos detalladas para generar anticuerpo monoclonales completamente humanos contra CD22 se describen en el Ejemplo 1, más adelante. La experiencia acumulada con varios antígenos ha demostrado que el ratón transgénico responde cuando se inmuniza inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, se ha descubierto que también son eficaces otros adyuvantes diferentes a los de Freund. Además, se ha descubierto que las células completas, en ausencia de adyuvante, son fuertemente inmunógenas. La respuesta inmunitaria se puede vigilar durante el protocolo de inmunización con muestras de plasma, que se obtiene mediante extracción de sangre retroorbital. El plasma se puede cribar por ELISA (como se describe más adelante), y los ratones con títulos de inmunoglobulina humana contra CD22 suficientes se pueden usar en las fusiones. Se puede proporcionar un refuerzo por vía intravenosa a los ratones con el antígeno 3 días antes del sacrificio y extirpación de los bazo. Se espera que sean necesarias 2-3 fusiones para cada inmunización. Para cada antígeno se suelen inmunizar entre 6 y 24 ratones. Normalmente, se utilizan ambas cepas HCo7 y HCo12. Además, ambos transgenes HCo7 y HCo12 se pueden reproducir conjuntamente en un mismo ratón que tenga dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). De manera alternativa o adicional, se pueden usar las cepas KM Mouse® y/o KM- λ HAC, como se describe en el Ejemplo 1.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación

- Para generar hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación, se pueden aislar esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea de células inmortalizadas adecuadas, tal como una línea de célula de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, suspensiones monocelulares de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados se pueden fusionar con un sexto de la cantidad de células P3X63-Ag8.653 de mieloma de ratón no secretable (ATCC, CRL 1580) con 50 % PEG. Como alternativa, la suspensión monocelular de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados se puede fusionar usando un método de electrofusión basado en un campo eléctrico, usando un electroporador de fusión celular CytoPulse de cámara grande (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland). Las células se sembraron en placas a aproximadamente 2×10^5 en placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero de feto Clone al 20 %, medio condicionado "653" al 18 %, 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio, donde el HAT se ha sustituido por HT. A continuación, los pocillos individuales se cribaron mediante ELISA para buscar anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG. Una vez que ha producido un amplio crecimiento del hibridoma, el medio se puede observar por lo general después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos se pueden volver a sembrar en placas, cribarse de nuevo, y si sigue siendo positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar después *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en medio de cultivo de tejido para su caracterización.

- 45 Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, hibridomas seleccionados se pueden hacer crecer en matraces de centrífuga a de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar pureza. La solución tampón se puede intercambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por DO₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se puede distribuir en alícuotas y almacenarse a -80° C.

Generación de trasfectomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación

- 55 Los anticuerpos de la presente divulgación también se puede producir en un trasfectoma de célula hospedadora usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

- Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo del mismo, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa se pueden obtener por técnicas convencionales de biología molecular normalizadas (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN se pueden introducir en vectores de expresión de tal forma que los genes estén operativamente unidos a secuencias control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que el término "unido operativamente" signifique que un gen de un anticuerpo está ligado en un vector de tal manera que las secuencias control de la transcripción y la traducción comprendidas en el vector sirvan para su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control

de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión empleada.

El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en un vector separado o, más normalmente, se insertan ambos genes en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión según métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector o mediante ligamiento de extremos romos en caso de que no haya sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo introduciendo en los mismos los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera del isotipo deseado de tal forma que el segmento V_H está operativamente unido a uno o varios segmentos C_H del vector y el segmento V_L está operativamente unido al segmento C_L dentro del vector. De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de la célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal se une en marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la presente divulgación llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como los promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Como alternativa, se pueden utilizar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la globina β. Adicionalmente, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes procedencias, tales como el sistema promotor SRα, que contiene secuencias procedentes del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos Tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la presente divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, el gen marcador de selección confiere normalmente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación en metotrexato) y el gen neo (para selección en G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el(los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesada y ligera se transfecta(n) en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una gran variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, *por ejemplo*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la presente divulgación en células hospedadoras tanto procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas y, con máxima preferencia, en células hospedadoras de mamífero, es lo más preferido porque dichas células eucariotas y en particular las células de mamífero, es más probable que las células procariotas se ensamblen y secreten un anticuerpo plegado e inmunológicamente activo. Se ha notificado la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de elevados rendimientos de anticuerpos activos (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la presente divulgación incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células CHO dhfr, descritos en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección de DHFR, *por ejemplo*, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células NSO de mieloma, células COS y células SP2. En particular, para su uso en células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS divulgado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338.841 (de Bebbington). Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, se producen los anticuerpos cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo

en el que se hacen crecer las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos de la invención se pueden analizar para determinar su unión a CD22 mediante, por ejemplo, ELISA convencional. Brevemente, las placas de microtitulación se revisten con CD22 purificado y/ recombinante (por ejemplo, ECD CD22 como se describe en el Ejemplo 1) a 0,25 µg/ml en PBS, y a continuación se bloquean con albúmina de suero bovino al 5 % en PBS. Las diluciones del anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con CD22) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavaron con PBS/Tween y a continuación se incubaron con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de cabra dirigido contra IgG Fc humana) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Tras el lavado, las placas se revelaron con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizaron a una DO de 405-650. Preferentemente, los ratones que desarrollaron los títulos más altos se utilizarán en las fusiones.

Un ensayo ELISA, como se ha descrito anteriormente, también se puede utilizar para cribar hibridomas que muestran reactividad positiva con el inmunógeno CD22. Los hibridomas que se unen con elevada avidéz a CD22 se subclonaron y se caracterizaron adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células precursoras (según ELISA), se puede seleccionar para fabricar un banco de células en 5-10 viales almacenados a -140°C, y para la purificación del anticuerpo.

Para purificar los anticuerpos dirigidos contra CD22, hibridomas seleccionados se pueden hacer crecer en matraces de centrífuga a de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefrosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar pureza. La solución tampón se puede intercambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden distribuir en alícuotas y almacenarse a -80° C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD22 se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición con anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se puede llevar a cabo con placas ELISA revestidas de CD22 como se ha descrito anteriormente. La unión de los mAb biotinilados se puede detectar con una sonda estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden llevar a cabo ELISA de isotipo usando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo en particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, los pocillos de las placas de microtitulación se pueden revestir con 1 µg/ml de anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina humana durante la noche a 4°C. Tras bloquear con BSA al 1 %, las placas se hicieron reaccionar con 1 µg /ml o menos de anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante una o dos horas. A continuación, los pocillos se pueden hacer reaccionar con IgG1 humana o bien sondas específicas de IgM humana conjugadas con fosfatasa alcalina. Las placas se revelaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente.

Las IgG contra CD22 humana se pueden analizar adicionalmente para determinar su reactividad con el antígeno CD22 mediante transferencia Western. Brevemente, CD22 se puede preparar y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Tras la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con suero de feto de ternera al 10 %, y se sondearon con el anticuerpo monoclonal a analizar. La IgG humana unida se puede detectar usando anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

La especificidad de unión de un anticuerpo de la presente divulgación también se puede determinar mediante la supervisión de la unión del anticuerpo a células que expresan CD22, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Una línea de células que expresa naturalmente CD22, tal como una célula Daudi o una célula Raji, es de utilidad, o una línea de células, tal como una línea de células CHO, se puede transfectar con un vector de expresión que codifica una forma transmembrana de CD22. La proteína transfectada puede comprender una etiqueta, tal como una etiqueta myg, preferentemente en el extremo N, para la detección mediante un anticuerpo dirigido a la etiqueta. La unión de un anticuerpo de la presente divulgación a CD22 se puede determinar mediante la incubación de las células transfectadas con el anticuerpo, y detectar el anticuerpo unido. La unión de un anticuerpo a la etiqueta en la proteína transfectada se puede usar como control positivo.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, se describen moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo dirigido contra CD22, o un

fragmento del mismo, de la presente divulgación. Un anticuerpo de la presente divulgación, o porciones de unión a antígeno del mismo, se puede derivatizar o unir a otra molécula funcional, *por ejemplo*, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando de un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de la presente divulgación puede derivatizarse o unirse, de hecho, a más de una molécula funcional adicional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas diferentes; también se pretende que dichas moléculas biespecíficas queden abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" tal como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica, un anticuerpo de la presente divulgación se puede unir adicionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión diferentes, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de forma que se produzca una molécula biespecífica.

Por consiguiente, las moléculas biespecíficas comprenden al menos una primera especificidad de unión por CD22 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. El segundo epítipo diana puede ser un receptor Fc, *por ejemplo*, FcγRI (CD64) humano o un receptor Fcα humano (CD89). Por lo tanto, dichas moléculas biespecíficas son capaces de unirse a células efectoras que expresan FcγR o FcαR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)) y a células diana que expresan CD22. Estas moléculas biespecíficas dirigen las células que expresan CD22 a células efectoras y disparan las actividades de las células efectoras mediadas por Fc, tales como la fagocitosis de las células que expresan CD22, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), liberación de citoquinas, o generación del anión superóxido.

En una realización en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de la especificidad de unión contra Fc y una especificidad de unión contra CD22. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción del factor antipotenciación (EF), *por ejemplo*, una molécula que se une a una proteína superficial implicada en la actividad citotóxica y que aumenta por tanto la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La "porción del factor antipotenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional, o un ligando que se une a una molécula dada, *por ejemplo*, un antígeno o un receptor, y de esta forma da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión por el receptor Fc o el antígeno de una célula diana. La "porción del factor antipotenciación" se puede unir a un receptor Fc o a un antígeno de una célula diana. Como alternativa, la porción del factor antipotenciación se puede unir a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la porción del factor antipotenciación se puede unir a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que dé como resultado una mayor respuesta inmunitaria contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas comprenden, como especificidad de unión, al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluyen, *por ejemplo*, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de la cadena ligera o la cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo de las mismas, tal como un Fv o una construcción monocaténaria como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778 de Ladner et al.

En una realización, la especificidad de unión por un receptor Fcγ se proporciona mediante un anticuerpo monoclonal, cuya unión no se bloquea mediante la inmunoglobulina G (IgG) humana. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y situados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas del receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases del receptor de Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor de Fcγ es un receptor de FcγRI de alta afinidad humano. El FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra una elevada afinidad para la IgG monomérica (10⁸ - 10⁹ M⁻¹).

La producción y caracterización de determinados anticuerpos monoclonales dirigidos contra Fcγ se describe en la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de Estados Unidos N.º 4.954.617 de Fanger et al. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es diferente del sitio de unión a Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no queda prácticamente bloqueada por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos dirigidos contra FcγRI útiles en la presente divulgación son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible de la American Type Culture Collection, n.º de registro ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo dirigido contra Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al. (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y en la publicación PCT WO 94/10332 de Tempest et al. La línea de células que produce el anticuerpo H22 se depositó en la American Type Culture Collection con la designación HA022CL1 y tiene el n.º de registro CRL 11177.

En otras realizaciones adicionales, la especificidad de unión para un receptor Fc se proporciona mediante un anticuerpo que se une al receptor de la IgA humana, *por ejemplo*, un receptor Fc-alfa (FcαRI (CD89)), cuya unión preferentemente no se bloquea mediante la inmunoglobulina A (IgA) humana. La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un α-gen (FcαRI) situado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana de corte y empalme alternativo de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa

constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células efectoras. Fc α RI tiene afinidad media ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) por IgA1 y IgA2, que aumenta tras la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc α RI fuera del dominio de unión al ligando IgA, se han descrito (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc α RI y Fc γ RI son receptores desencadenantes preferidos para su uso con las moléculas biespecíficas porque (1) se expresan principalmente en las células efectoras inmunitarias, *por ejemplo*, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan con altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median la potenciación de la presentación de antígeno para los antígenos, incluidos los autoantígenos, dirigidos a los mismos.

Aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas son anticuerpos monoclonales de murino, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas se pueden preparar mediante conjugación de componentes de especificidades de unión, *por ejemplo*, las especificidades de unión contra FcR y contra CD22, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y posteriormente conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar varios agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véanse por ejemplo Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. n.º 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlace sulfhidrilo en las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de restos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión se puede codificar en el mismo vector, y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es especialmente útil cuando la molécula biespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x proteína de fusión Fab. Una molécula biespecífica puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. números 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar mediante, por ejemplo, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o ensayo por transferencia Western. Cada uno de estos ensayos detecta de forma general la presencia de complejos proteína-anticuerpo de especial interés, mediante el uso de un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico del complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo se pueden detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a una enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de varios otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar radioactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

Enlazadores

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligando donde el anticuerpo está unido al ligando mediante un enlazador químico. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de peptidilo, y se representa gráficamente en el presente documento como (L⁴)_p—F—(L¹)_m. Otros enlazadores incluyen enlazadores de hidrazina y disulfuro, y se representa gráficamente en el presente documento como (L⁴)_p—H—(L⁴)_p o (L⁴)_p—J—(L¹)_m, respectivamente. Además de los enlazadores que se unen al ligando, la presente invención proporciona también brazos conectores escindibles que son adecuados para su unión a prácticamente cualquier especie molecular. Es aspecto del brazo del enlazador de la invención se ilustra en el presente documento por referencia a su unión a un resto terapéutico. Sin embargo, será muy evidente para un experto en la materia que los enlazadores se pueden unir a diferentes especies entre las que se incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes diagnósticos, agentes

analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, marcas detectables, y similares.

El uso de peptídico y otros enlazadores en conjugados de anticuerpo-ligando se describe en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos con números 2003/0050331; 2003/0064984; 2006/0004081; 2006/0024317; y en la patente de Estados Unidos n.º 7.714.016 y en la patente de Estados Unidos n.º 6.989.452 y en la publicación de Patente PCT n.º WO 2007/038658.

Se describen enlazadores adicionales en la patente de los Estados Unidos n.º 6.214.345 (Bristol-Myers Squibb), en la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0096743 y en la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0130189 (ambas de Seattle Genetics), de Groot et al., J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot et al. J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot et al., J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180 (Syntarga); Carl et al., J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik y col., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998).

Los enlazadores pueden ser útiles para unir grupos de direccionamiento a agentes terapéuticos y marcadores. Los enlazadores pueden transmitir estabilidad a los compuestos, reducir su toxicidad *in vivo*, o afectar favorablemente su farmacocinética, biodisponibilidad, y/o farmacodinámica. Se prefiere por lo general que el enlazador se escinda, liberando el fármaco activo, una vez que el fármaco se administre a su sitio de acción. Por lo tanto, en una realización, los enlazadores son no trazables, de tal forma que una vez separado del agente terapéutico o marcador (tal como durante la activación), no queda traza de la presencia del enlazador.

En otra realización, los enlazadores se caracterizan por su capacidad para escindirse en un sitio o cerca de la célula diana tal como en el sitio de la acción terapéutica o actividad de marcación. Dicha escisión puede ser de tipo enzimático. Esta característica ayuda a reducir la activación sistémica del agente terapéutico o marcador, reduciendo la toxicidad y los efectos secundarios sistémicos. Los grupos escindibles para escisión enzimática pueden incluir enlaces peptídicos, enlaces éster y enlaces disulfuro. En otras realizaciones, los enlazadores son sensibles al pH y se escinden mediante cambios en el pH.

Un aspecto importante es la capacidad para controlar la velocidad con la que se escinden los enlazadores. Frecuentemente, se desea un enlazador que se escinde rápidamente. En algunas realizaciones, sin embargo, se puede preferir un enlazador que se escinde más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación con un componente tanto de liberación rápida como de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinde más lentamente. El documento WO 02/096910 proporciona varios complejos de ligando-fármaco específicos que tienen un enlazador de hidrazina. Sin embargo, no hay forma de "ajustar" la composición del enlazador dependiendo de la velocidad de ciclación necesaria, y los compuestos concretos descritos escinden el ligando del fármaco a una velocidad más lenta de lo preferido para muchos conjugados de fármaco-ligando. Por el contrario, los enlazadores de hidrazona proporcionan una gama de velocidades de ciclación, desde muy rápida a muy lenta, permitiendo de esta forma la selección de un enlazador de hidrazina particular basado en la velocidad de ciclación deseada.

Por ejemplo, se puede conseguir una ciclación muy rápida con enlazadores de hidrazina que producen un anillo de 5 miembros tras la escisión. Las velocidades de ciclación preferidas para la administración dirigida de un agente citotóxico a células se consiguen usando enlazadores de hidrazina que producen, tras la escisión, bien dos anillos de 5 miembros o un único anillo de 6 miembros resultado de un enlazador que tiene dos metilos en la posición geminal. Se ha mostrado que el efecto *gem*-dimetilo acelera la velocidad de la reacción de ciclación, en comparación con un único anillo de 6 miembros sin los dos metilos en la posición geminal. Esto procede de la cadena que se elimina del anillo. A veces, sin embargo, los sustituyentes pueden ralentizar la reacción en lugar de acelerarla. Frecuentemente, los motivos del retraso se pueden deber al impedimento estérico. Por ejemplo, la sustitución *gem*-dimetilo permite que se produzca una reacción de ciclación mucho más rápida, en comparación al caso donde el carbono geminal es CH₂.

Es importante señalar, sin embargo, que en algunas realizaciones, se puede preferir un enlazador que se escinde más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación con un componente tanto de liberación rápida como de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinde más lentamente. En determinadas realizaciones, se consigue una velocidad de ciclación lenta usando un enlazador de hidrazina que produce, tras la escisión, bien un único anillo de 6 elementos, sin la sustitución *gem*-dimetilo, o un único anillo de 7 miembros.

Los enlazadores también sirven para estabilizar el agente terapéutico o el marcador contra la degradación mientras se encuentra en la circulación. Este rasgo proporciona un beneficio significativo porque dicha estabilización da como resultado una semivida en circulación prolongada del agente o marcador adjunto. El enlazador también sirve para atenuar la actividad del agente o marcador adjunto, de forma que el conjugado es relativamente benigno mientras está en la circulación y tiene el efecto deseado, por ejemplo, es tóxico, tras su activación en el sitio de acción deseado. Para conjugados de agente terapéutico, este rasgo del enlazador sirve para mejorar el índice terapéutico del agente.

Los grupos estabilizantes se seleccionan preferentemente para limitar el aclaramiento del agente terapéutico o el

marcador por las enzimas que pueden estar presente en la sangre o en el tejido no diana, y se seleccionan adicionalmente para limitar el transporte del agente o marcador al interior de las células. Los grupos estabilizantes sirven para bloquear la degradación del agente o marcador y también pueden actuar para proporcionar otras características físicas del agente o marcador. El grupo estabilizante también puede mejorar la estabilidad del agente o marcador durante almacenamiento en una manera tanto formulada como no formulada.

Idealmente, el grupo estabilizante es útil para estabilizar un agente terapéutico o marcador si sirve para proteger el agente o marcador de la degradación cuando se analiza durante el almacenamiento del agente o marcador en la sangre humana a 37 °C durante 2 horas y da como resultado menos de un 20 %, preferentemente menos de un 10 %, más preferentemente menos de un 5 % e incluso más preferentemente menos de un 2 %, de escisión del agente o marcador por las enzimas presente en la sangre humana en las condiciones de ensayo dadas.

Se pueden usar profármacos para el tratamiento de enfermedades, especialmente para la quimioterapia contra el cáncer. El uso de los enlazadores descritos en el presente documento proporciona profármacos que presentan una elevada especificidad de acción, una toxicidad reducida, y una estabilidad mejorada en sangre con respecto a profármacos de estructura similar.

Los enlazadores descritos en el presente documento pueden estar presentes en varias posiciones dentro de la molécula ligando.

Por lo tanto, un enlazador puede contener cualquiera de varios grupos como parte de su cadena que se van a escindir *in vivo*, por ejemplo, en el torrente sanguíneo, a una velocidad que está mejorada con respecto a otras construcciones que carecen de dichos grupos. También se describen conjugados de los brazos enlazadores con agentes terapéuticos y diagnósticos. Los enlazadores son útiles para formar análogos de profármaco de agentes diagnósticos, y se unen de forma reversible un agente terapéutico o diagnóstico a un agente de direccionamiento, una etiqueta detectable, o un soporte sólido. Los enlazadores se pueden incorporar a complejos que incluyen las citotoxinas descritas en el presente documento.

Además del péptido escindible, hidrazina, o grupo disulfuro, uno o más grupos enlazadores autoinmolables L^1 se introducen opcionalmente entre la citotoxina y el agente de direccionamiento. Estos grupos enlazadores también se pueden describir como grupos separadores y contienen al menos dos grupos funcionales reactivos. Normalmente, una funcionalidad química del grupo separador se une a una funcionalidad química del agente terapéutico, *por ejemplo*, citotoxina, mientras que la otra funcionalidad química del grupo separador se utiliza para unirse a una funcionalidad química del agente de direccionamiento o del enlazador escindible. Los ejemplos de funcionalidades químicas de los grupos separadores incluyen grupos hidroxilo, mercapto, carbonilo, carboxi, amino, cetona, y mercapto.

Los enlazadores autoinmolables, representados por L^1 , son generalmente alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o un grupo heteroalquilo sustituido o no sustituido. En una realización, los grupos alquilo o arilo pueden comprender entre 1 y 20 átomos de carbono. También pueden comprender un resto polietilenglicol.

Los grupos separadores ilustrativos incluyen, por ejemplo, 6-aminohexanol, 6-mercaptohexanol, ácido 10-hidroxidecanoico, glicina y otros aminoácidos, 1,6-hexanodiol, β -alanina, 2-aminoetanol, cisteamina (2-aminoetanotiol), ácido 5-aminopentanoico, ácido 6-aminoheptanoico, ácido 3-maleimidobenzoico, ftalida, ftalidas α -sustituidas, el grupo carbonilo, ésteres de amina, ácidos nucleicos, péptidos y similares.

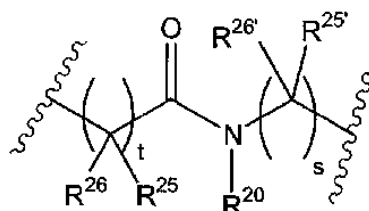
El separador puede servir para introducir masa molecular y funcionalidades químicas adicionales en el complejo de agente de direccionamiento de citotoxinas. En general, la masa y funcionalidad adicionales alterarán la semivida en suero y otras propiedades del complejo. Por lo tanto, mediante una selección cuidadosa de los grupos separadores, se pueden producir complejos de citotoxina con varias semividas en suero.

El uno o varios separadores situados adyacentes al resto de fármaco también se denotan como $(L^1)_m$, en la que m es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Cuando están presentes múltiples separadores L^1 , se pueden usar separadores idénticos o diferentes. L^1 puede ser cualquier grupo autoinmolable.

L^4 es un resto enlazador que transmite preferentemente mayor solubilidad o menos propiedades de agregación a los conjugados utilizando un enlazador que contiene el resto o modifica la tasa de hidrólisis del conjugado. El enlazador L^4 no tiene que ser autoinmolable. En una realización, el resto L^4 es alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, o heteroalquilo no sustituido, cualquiera de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. Las sustituciones pueden ser, por ejemplo, un alquilo inferior (C_1 - C_6), alcoxi, alquiltio, alquilamino o dialquilamino. En determinadas realizaciones, L^4 comprende un resto no cíclico. En otra realización, L^4 comprende cualquier polímero de aminoácido cargado positiva o negativamente, tal como polilisina o poliarginina. L^4 puede comprender un polímero tal como un resto polietilenglicol. Adicionalmente, el enlazador L^4 puede comprender, por ejemplo, tanto un componente de polímero como un resto químico pequeño.

L^4 puede comprender un resto polietilenglicol (PEG). La porción PEG de L^4 puede tener entre 1 y 50 unidades de longitud. Preferentemente, el PEG tendrá 1-12 unidades de repetición, más preferentemente 3-12 unidades de repetición, más preferentemente 2-6 unidades de repetición, o incluso más preferentemente 3-5 unidades de repetición y lo más preferido 4 unidades de repetición. L^4 puede consistir solamente en el resto PEG, o también puede contener un alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido adicional. Es útil combinar PEG como parte del resto L^4 para mejorar la solubilidad en agua del complejo. Adicionalmente, el resto PEG reduce el grado de agregación que se puede producir durante la conjugación del fármaco con el anticuerpo.

En algunas realizaciones, L^4 comprende



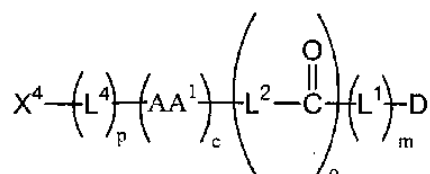
unido directamente al extremo N de $(AA^1)_c$. R^{20} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo. Cada R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} , y $R^{26'}$ se selecciona independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y s y t son independientemente números enteros de 1 a 6. Preferentemente, R^{20} , R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son hidrófobos. En algunas realizaciones, R^{20} es H o alquilo (preferentemente alquilo inferior no sustituido). En algunas realizaciones, R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son independientemente H o alquilo (preferentemente, alquilo C^1 a C^4 no sustituido). En algunas realizaciones, R^{25} , $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son todos H. En algunas realizaciones, t es 1 y s es 1 o 2.

Enlazadores peptídicos (F)

Como se analiza anteriormente, los enlazadores peptídicos se pueden representar mediante la fórmula general: $(L^4)_p-F-(L^1)_m$, en la que F representa la porción enlazador a que comprende el resto peptídico.

En una realización, la porción F comprende uno o más enlazadores autoinmolables adicionales, L^2 , y un grupo carbonilo. En otra realización, la porción F comprende un grupo amino y uno o más grupos separadores opcionales, L^3 .

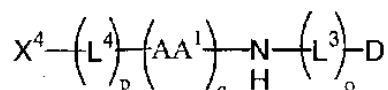
Por consiguiente, en una realización, el conjugado que comprende el enlazador de peptidilo comprende una estructura de la siguiente fórmula (a):



En esta realización, L^1 es un enlazador autoinmolable, como se ha descrito anteriormente, y L^4 es un resto que transmite preferentemente mayor solubilidad, o menores propiedades de agregación, o modifica la tasa de hidrólisis, como se ha descrito anteriormente. L^2 representa uno o más enlazadores autoinmolables. Además, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y o y p son independientemente 0 o 1. AA^1 representa uno o más aminoácidos naturales, y/o α -aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 a 20. En algunas realizaciones, c está en el intervalo de 2 a 5 o c es 2 o 3.

En los enlazadores peptídicos de la anterior fórmula (a), AA^1 está unido, por su extremo amino, bien directamente a L^4 o, cuando L^4 está ausente, directamente al grupo X^4 (es decir, el agente de direccionamiento, marca detectable, grupo funcional reactivo protegido, o grupo funcional reactivo no protegido). En algunas realizaciones, cuando L^4 está presente, L^4 no comprende un grupo acilcarboxílico unido directamente al extremo N de $(AA^1)_c$. Así, no es necesario en estas realizaciones que haya una unidad de acilcarboxílico directamente unida entre cualquiera de L^4 o X^4 y AA^1 , como es necesario en los enlazadores peptídicos de la patente de Estados Unidos n.º 6.214.345.

En otra realización, el conjugado que comprende el enlazador de peptidilo comprende una estructura de la siguiente fórmula (b):



En esta realización, L^4 es un resto que transmite preferentemente mayor solubilidad, o menores propiedades de agregación, o modifica la tasa de hidrólisis, como se ha descrito anteriormente; L^3 es un grupo separador que comprende una amina primaria o secundaria o un grupo funcional de carboxilo, y cualquier amina de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional de carboxilo colgante de D, o el carboxilo de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional de amina de D; y o y p son independientemente 0 o 1. AA^1 representa uno o más aminoácidos naturales, y/o α -aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 a 20. En esta realización, L^1 está ausente (es decir, m es 0 en la fórmula general).

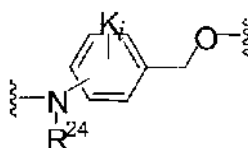
En los enlazadores peptídicos de la anterior fórmula (b), AA^1 está unido, por su extremo amino, bien directamente a L^4 o, cuando L^4 está ausente, directamente al grupo X^4 (es decir, el agente de direccionamiento, marca detectable, grupo funcional reactivo protegido, o grupo funcional reactivo no protegido). En algunas realizaciones, cuando L^4 está presente, L^4 no comprende un grupo acilcarboxílico unido directamente al extremo N de $(AA^1)_c$. Así, no es necesario en estas realizaciones que haya una unidad de acilcarboxílico directamente unida entre cualquiera de L^4 o X^4 y AA^1 , como es necesario en los enlazadores peptídicos de la patente de Estados Unidos n.º 6.214.345.

El enlazador autoinmolable L^2

El enlazador autoinmolable L^2 es un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente entre sí dos restos químicos separados en una molécula tripartita normalmente estable, liberando uno de dichos restos químicos separados de la molécula tripartita mediante escisión enzimática; y después de dicha escisión enzimática, escindir espontáneamente el resto de la molécula para liberar el otro de dichos restos químicos separados. De acuerdo con la presente invención, el separador autoinmolable está unido covalentemente por uno de sus extremos al resto peptídico y unido covalentemente por el otro extremo al sitio químicamente reactivo del resto de fármaco cuya derivatización inhibe la actividad farmacológica, de forma que separa y une covalentemente entre sí el resto peptídico y el resto de fármaco en una molécula tripartita que es estable y farmacológicamente inactivos en ausencia de la enzima diana, pero que se puede escindir enzimáticamente por dicha enzima diana en el enlace que une covalentemente el resto separador y el resto peptídico para realizar de esta forma la liberación del resto peptídico desde la molécula tripartita. Dicha escisión enzimática, a su vez, activará el carácter autoinmolable del resto separador e iniciará la escisión espontánea del enlace que une covalentemente el resto separador con el resto de fármaco, para realizar de esta manera la liberación del fármaco en una forma farmacológicamente activa.

El enlazador autoinmolable L^2 puede ser un grupo autoinmolable. Preferentemente, L^2 es un alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, arilo sustituido y no sustituido, y heteroarilo sustituido y no sustituido.

Un separador autoinmolables especialmente preferido L^2 se puede representar mediante la fórmula (c):



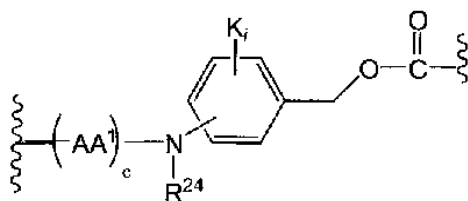
El anillo aromático del grupo aminobencilo se puede sustituir por uno o más grupos "K". Un grupo "K" es un sustituyente del anillo aromático que sustituye a un hidrógeno por otra parte unido a uno de los cuatro átomos de carbono no sustituidos que forman parte de la estructura del anillo. El grupo "K" puede ser un solo átomo, tal como un halógeno, o puede ser un grupo multiatómico, tal como alquilo, heteroalquilo, amino, nitro, hidroxilo, alcoxi, haloalquilo, y ciano. Cada K se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCONR^{21}R^{22}$, $OCOR^{21}$, y OR^{21} , en la que R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido y heterocicloalquilo no sustituido. Los sustituyentes K ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, F, Cl, Br, I, NO_2 , OH, OCH_3 , $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ y metilo. Para " K_i ", i es un número entero de 0, 1, 2, 3, o 4. En una realización preferida, i es 0.

El oxígeno éter de la estructura anteriormente mostrada está unido a un grupo carbonilo. La línea entre la funcionalidad NR^{24} hacia el grupo aromático indica que la funcionalidad amino puede estar unida a cualquiera de los

cinco átomos de carbono que a la vez forman el anillo y no están sustituidos por el grupo $-\text{CH}_2-\text{O}-$. Preferentemente, la funcionalidad NR^{24} de X está covalentemente unida al anillo aromático en la posición para con respecto al grupo $-\text{CH}_2-\text{O}-$. R^{24} es un elemento seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido. En una realización específica, R^{24} es hidrógeno.

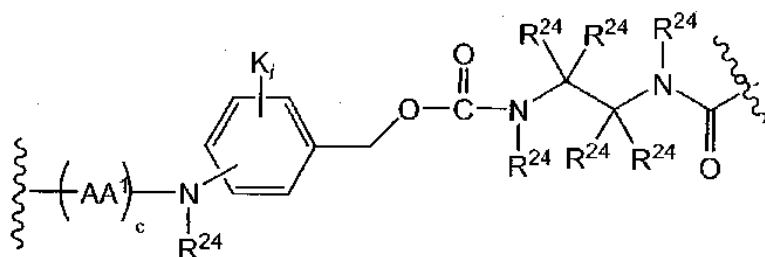
5

Un enlazador peptídico puede tener la estructura de la anterior fórmula (a), en la que F comprende la estructura:



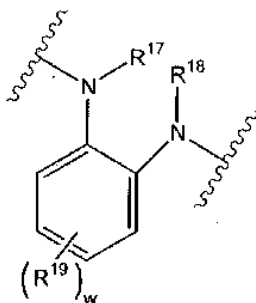
10 donde R^{24} se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido. Cada K es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 , $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, $\text{NR}^{21}\text{COR}^{22}$, $\text{OCONR}^{21}\text{R}^{22}$, OCOR^{21} , y OR^{21} donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido; e i es un número entero de 0,1, 2, 3, o 4.

20 En otra realización, el enlazador peptídico de la anterior fórmula (a) comprende un $-\text{F}(\text{L}^1)_m-$ que comprende la estructura:



25 donde cada R^{24} es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido.

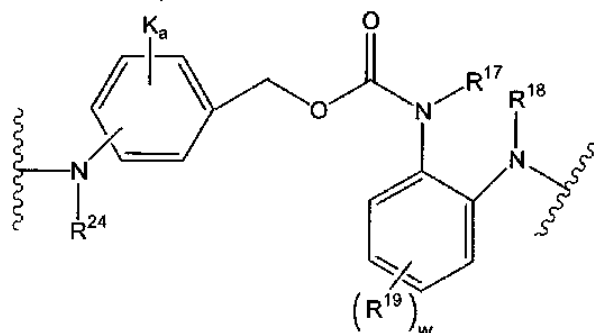
En algunas realizaciones, el separador autoinmolable L^1 o L^2 incluye



30

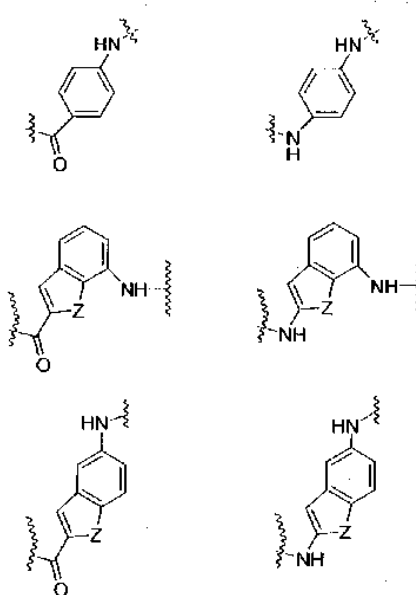
35 donde cada R^{17} , R^{18} , y R^{19} se selecciona independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, y w es un número entero de 0 a 4. En algunas realizaciones, R^{17} y R^{18} son independientemente H o alquilo (preferentemente, alquilo C1-4 no sustituido). Preferentemente, R^{17} y R^{18} son alquilo C1-4, tal como metilo o etilo. En algunas realizaciones, w es 0. Sin desear quedar ligado a cualquier teoría en particular, se ha descubierto experimentalmente que este separador autoinmolable concreto se cicla relativamente rápido.

En algunas realizaciones, L^1 o L^2 incluye



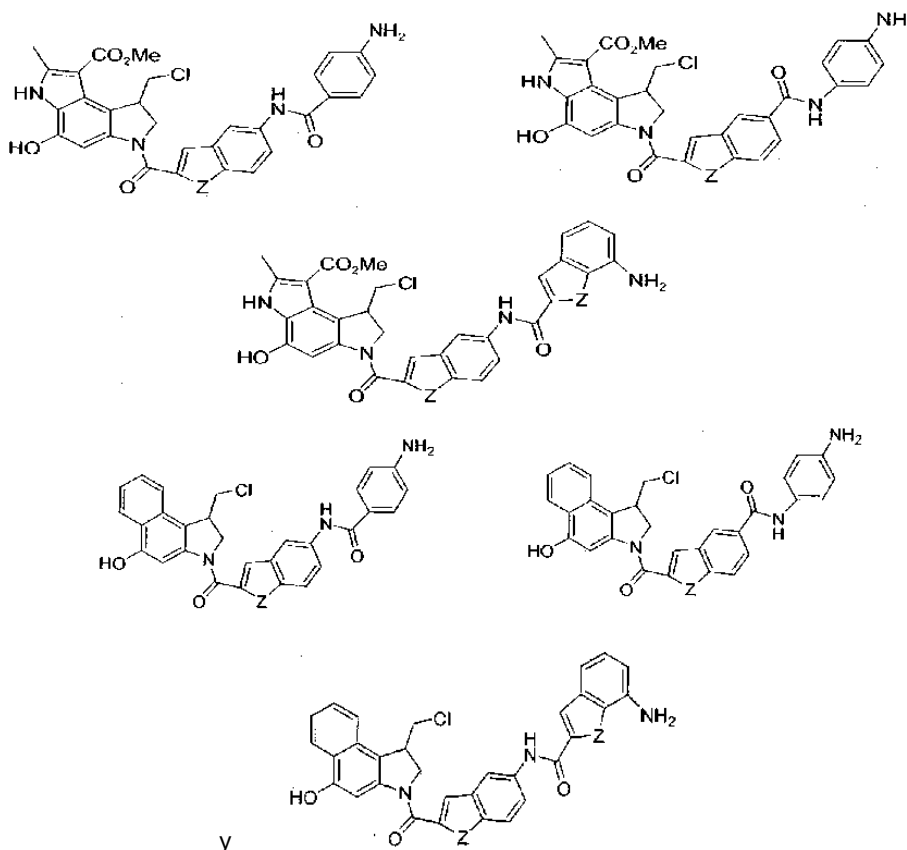
5 El grupo separador L^3

El grupo separador L^3 se caracteriza por que comprende una amina primaria o secundaria o un grupo funcional de carboxilo, y cualquiera de los grupos amina del L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional de carboxilo colgante de D o el carboxilo de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional de amina colgante de D. L^3 se puede seleccionar entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. L^3 puede comprender un grupo aromático. Más preferentemente, L^3 comprende un grupo de ácido benzoico, un grupo anilina o un grupo indol. Los ejemplos no limitantes de estructuras que pueden servir como un separador $-L^3-NH-$ incluyen las siguientes estructuras:



donde Z es un elemento seleccionados entre O, S y NR^{23} , y donde R^{23} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo.

Tras la escisión del enlazador que contiene L^3 , el resto L^3 permanece unido al fármaco, D. Por consiguiente, el resto L^3 se selecciona de tal forma que su presencia unida a D no altere significativamente la actividad de D. En otra realización, una porción del fármaco F funciona por sí mismo como el separador L^3 . Por ejemplo, en una realización, el fármaco, D, es un derivado de duocarmicina en el que una parte del fármaco funciona como el separador L^3 . Los ejemplos no limitantes de dichas realizaciones incluyen aquellos en los que $NH_2-(L^3)-D$ tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



- 5 donde Z es un elemento seleccionados entre O, S y NR²³, donde R²³ es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo; y donde el grupo NH₂ de cada estructura reacciona con (AA¹)_c para formar -(AA¹)_c-NH-.

La secuencia peptídica AA¹

- 10 El grupo AA¹ representa un único aminoácido o una pluralidad de aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces amida. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales y/o α-aminoácidos no naturales.

- 15 La secuencia peptídica (AA¹)_c es, funcionalmente, el resto de amidificación de un único aminoácido (cuando c=1) o de una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amida. El péptido se selecciona para dirigir la escisión catalizada por enzima del péptido por una enzima en un lugar de interés en un sistema biológico. Por ejemplo, para conjugados que se dirigen a una célula utilizando un agente de direccionamiento, pero que no se internalizan en dicha célula, se selecciona un péptido que se escinda mediante una o más de las proteasas que puedan existir en la matriz extracelular, por ejemplo, debido a la liberación de contenido celular desde células casi moribundas, de forma que el péptido se escinde extracelularmente. El número de aminoácidos dentro del péptido puede estar comprendido en un intervalo de 1 a 20; pero más preferentemente tendrá 1-8 aminoácidos, 1-6 aminoácidos o 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que comprenden (AA¹)_c. Las secuencias peptídicas que son susceptibles a la escisión mediante enzimas o clases de enzimas específicas son bien conocidas en la técnica.

- 25 Muchas secuencias peptídicas que se escinden por enzimas del suero, hígado, intestino, etc. son conocidas en la técnica. Una secuencia peptídica ilustrativa incluye una secuencia peptídica que se puede escindir mediante una proteasa. La descripción siguiente se centra en el uso de una secuencia sensible a proteasa para mayor claridad de la ilustración.

- 30 Cuando la enzima que escinde el péptido es una proteasa, el enlazador generalmente incluye un péptido que contiene una secuencia de reconocimiento para escisión por la proteasa. Una secuencia de reconocimiento para escisión por una proteasa es una secuencia de aminoácidos reconocida por la proteasa durante la escisión proteolítica. Se conocen en la técnica muchos sitios de escisión por proteasas, y estos y otros sitios de escisión se pueden incluir en el resto enlazador. Véanse, por ejemplo, Matayoshi *et al.* *Science* 247: 954 (1990); Dunn *et al.* *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah *et al.* *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber *et al.* *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith *et al.* *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); Bouvier *et al.* *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995), Hardy *et al.*, en Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's

Disease, ed. Masters *et al.* pp. 190-198 (1994).

Los aminoácidos de la secuencia peptídica (AA¹)_C se seleccionan por su idoneidad para la escisión enzimática selectiva mediante moléculas concretas tales como proteasas asociadas a tumor. Los aminoácidos utilizados pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales. Pueden estar en la configuración L o D. En una realización, se utilizan al menos tres aminoácidos diferentes. En otra realización, solo se utilizan dos aminoácidos.

La secuencia peptídica (AA¹)_C se selecciona preferentemente por su capacidad para escindirse mediante proteasas lisosómicas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S. Preferentemente, la secuencia peptídica (AA¹)_C se puede escindir mediante la catepsina B *in vitro*, lo que se puede estudiar *in vitro* mediante ensayos de escisión con proteasas conocidos en la materia.

En otra realización, la secuencia peptídica (AA¹)_C se selecciona por su capacidad para escindirse por una proteasa asociada a tumor, tal como una proteasa que se encuentra extracelularmente en la proximidad de células tumorales, cuyos ejemplos no limitantes incluyen la oligopeptidasa thimet (TOP) y CD10. La capacidad de un péptido para escindirse con TOP o CD 10 se puede estudiar *in vitro* mediante ensayos de escisión con proteasas conocidos en la materia.

Los ejemplos adecuados, pero no limitantes, de secuencias peptídicas adecuadas para su uso en los conjugados de la invención incluyen Val-Cit, Cit-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosil-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ. ID NO: 94), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ. ID NO: 95) y Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ. ID NO: 96), Val-Ala, Leu-Leu-Gly-Leu (SEQ. ID NO: 97), Leu-Asn-Ala, y Lys-Leu-Val. Las secuencias peptídicas preferidas son Val-Cit y Val-Lys.

En otra realización, el aminoácido situado más cerca del resto de fármaco se selecciona entre el grupo que consiste en: Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, y Val. En otra realización más, el aminoácido situado más cerca del resto de fármaco se selecciona entre el grupo que consiste en: Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, y Val.

Las proteasas se han implicado en la metástasis del cáncer. Un aumento en la síntesis de la proteasa uroquinasa se correlacionó con una mayor capacidad para experimentar metástasis en muchos cánceres. Uroquinasa activa la plasmina a partir del plasminógeno, que está situada de forma ubicua en el espacio extracelular y su activación puede ocasionar la degradación de las proteínas de la matriz extracelular por las que invaden las células tumorales en metástasis. La plasmina también puede activar las collagenasas, estimulando de esta forma la degradación del colágeno en la membrana basal que rodea los capilares y el sistema linfático, permitiendo de esta forma que las células tumorales invadan los tejidos diana (Dano, *et al. Adv. Cancer. Res.*, 44:139 (1985)). Por lo tanto, una secuencia peptídica que se escinde mediante uroquinasa se puede usar como enlazador.

También se pueden usar secuencias peptídicas que son sensibles a la escisión por triptasas. Los mastocitos humanos expresan al menos cuatro triptasas diferentes, designadas αβI, βII, y βIII. Estas enzimas no están controladas por los inhibidores de la proteinasa del plasma sanguíneo y solamente escinden unos pocos sustratos fisiológicos *in vitro*. La familia triptasa de las serina proteasas se ha implicado en varias enfermedades alérgicas e inflamatorias que implican los mastocitos, dados los elevados niveles de triptasa que se encuentran en los fluidos biológicos de pacientes con estos trastornos. Sin embargo, el papel exacto de la triptasa en la patofisiología sigue sin estar claro. El ámbito de las funciones biológicas y las correspondientes consecuencias fisiológicas de la triptasa están prácticamente definidas por su especificidad de sustrato.

La triptasa es un potente activador del activador del plasminógeno prouroquinasa (uPA), la forma zimógena de una proteasa asociada con metástasis e invasión tumoral. La activación de la cascada del plasminógeno, que da como resultado la destrucción de la matriz extracelular para la extravasación y migración celular, puede ser una función de la activación por triptasa del activador del plasminógeno prouroquinasa en la secuencia P4-P1 de Pro-Arg-Phe-Lys (SEQ. ID NO: 98) (Stack, *et al. Journal of Biological Chemistry* 269 (13): 9416-9419 (1994)). El péptido intestinal vasoactivo, un neuropéptido que está implicado en la regulación de la permeabilidad vascular, también se escinde mediante triptasa, principalmente en la secuencia Thr-Arg-Leu-Arg (SEQ. ID NO: 99) (Tam, *et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3: 27-32 (1990)). El receptor acoplado a la proteína G PAR-2 se puede escindir y activar mediante triptasa en la secuencia Ser-Lys-Gly-Arg (SEQ. ID NO: 100) para impulsar la proliferación de fibroblastos, mientras que el receptor activado por trombina PAR-1 se inactiva mediante triptasa en la secuencia Pro-Asn-Asp-Lys (SEQ. ID NO: 101) (Molino *et al., Journal of Biological Chemistry* 272(7): 4043-4049 (1997)). Tomados en su conjunto, esta evidencia sugiere un papel fundamental de la triptasa en la remodelación de los tejidos como consecuencia de la enfermedad. Esto es coherente con los profundos cambios observados en algunos trastornos mediados por mastocitos. Un hito del asma crónica y otras enfermedades respiratorias de larga duración es la fibrosis y el engrosamiento de los tejidos subyacentes que podrían ser el resultado de la activación de la triptasa en sus dianas fisiológicas. Análogamente, una serie de informes ha mostrado que la angiogénesis está asociada con la densidad de mastocitos, actividad triptasa, y mal pronóstico en varios cánceres (Coussens *et al. Genes and Development* 13(11): 1382-97 (1999)); Takanami *et al., Cancer* 88(12): 2686-92 (2000); Toth-Jakatics *et al., Human Pathology*

31(8): 955-960 (2000); Ribatti *et al.*, *International Journal of Cancer* 85(2): 171-5(2000)).

Se conocen en la técnica métodos para evaluar si una determinada proteasa escinde una secuencia peptídica seleccionada. Por ejemplo, el uso del sustrato peptídico fluorogénico 7-amino-4-metil cumarina (AMC) es un método bien establecido para la determinación de la especificidad de proteasas (Zimmerman, M., *et al.*, (1977) *Analytical Biochemistry* 78:47-51). La escisión específica del enlace anilida libera el grupo saliente AMC fluorogénico, permitiendo la determinación sencilla de las tasas de escisión desde sustratos individuales. Más recientemente, las matrices (Lee, D., *et al.*, (1999) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9:1667-72) y las bibliotecas de cribado por posición (Rano, T.A., *et al.*, (1997) *Chemistry and Biology* 4:149-55) de bibliotecas de sustratos peptídicos AMC se han utilizado para realizar un perfilado rápido de la especificidad del extremo N de las proteasas con muestreo de una amplia gama de sustratos en un único experimento. Por lo tanto, un experto en la materia puede evaluar fácilmente una matriz de secuencias peptídicas para determinar su utilidad en la presente invención sin recurrir a experimentación excesiva.

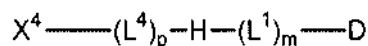
El conjugado de anticuerpo-ligando puede contener opcionalmente dos o más enlazadores. Estos enlazadores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, se puede usar un enlazador de peptidilo para conectar el fármaco con el ligando y un segundo enlazador de peptidilo puede vincular un agente diagnóstico al complejo. Otros usos de los enlazadores adicionales incluyen unir agentes analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, y etiquetas detectables, al complejo de anticuerpo-ligando.

Los compuestos pueden ser especies polivalentes o multivalentes, que incluyen, por ejemplo, especies tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, y homólogos superiores de los compuestos de la invención, o reactivos análogos de los mismos también se han descrito. Las especies polivalentes y multivalentes se pueden ensamblar a partir de especies individuales o más de una especie de la invención. Por ejemplo, una construcción dimérica puede ser "homodimérica" o "heterodimérica". Además, se describen construcciones polivalentes y multivalentes en las que un compuesto de la invención o un reactivo análogo del mismo se une a una estructura oligomérica o polimérica (por ejemplo, polilisina), dextrano, hidroxietil almidón, y similares). La estructura preferentemente es polifuncional (es decir, que tiene una matriz de sitios reactivos para unir los compuestos de la invención). Además, la estructura se puede derivatizar con una especie individual o más de una especie.

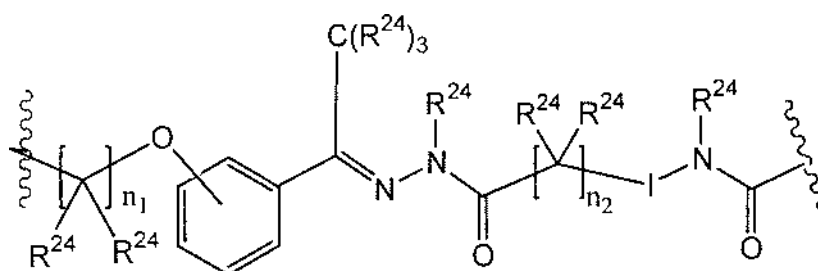
Además, los compuestos se pueden funcionalizar para proporcionar compuestos que tengan una solubilidad en agua mejorada con respecto a compuestos análogos que no se hayan funcionalizado de forma similar. Por lo tanto, cualquiera de los sustituyentes definidos en el presente documento se puede sustituir por radicales análogos que tengan una solubilidad en agua mejorada. Por ejemplo, un grupo hidroxilo se puede sustituir por un diol, o una amina se puede sustituir por una amina cuaternaria, hidroxiamina, o resto similar más soluble en agua. Una solubilidad en agua adicional se transmite mediante la sustitución en un sitio no esencial para la actividad frente al canal del ion de los compuestos definidos en el presente documento con un resto que potencia la solubilidad en agua de los compuestos precursores. Los métodos para mejorar la solubilidad en agua de los compuestos orgánicos son conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, funcionalizar un núcleo orgánico con un resto cargado permanentemente, por ejemplo, amonio cuaternario, o un grupo que está cargado a un pH fisiológicamente relevante, por ejemplo, ácido carboxílico, amina. Otros métodos incluyen, agregar al núcleo orgánico grupos que contienen hidroxilo o amina, por ejemplo, alcoholes, polioles, poliéteres, y similares. Los ejemplos representativos incluyen, aunque no de forma limitativa, polilisina, polietilenimina, poli(etenglicol) y poli(propilenglicol). Se conocen en la técnica las químicas y estrategias de funcionalización de estos compuestos. Véanse, por ejemplo, Dunn, R.L., *et al.*, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.

Enlazadores de hidrazina (H)

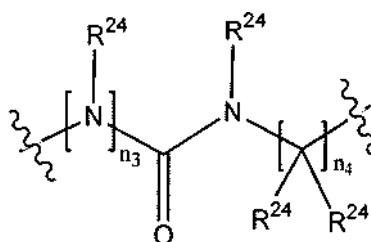
En una segunda realización, el conjugado de la invención comprende un enlazador autoinmolable de hidrazina, en el que el conjugado tiene la estructura:



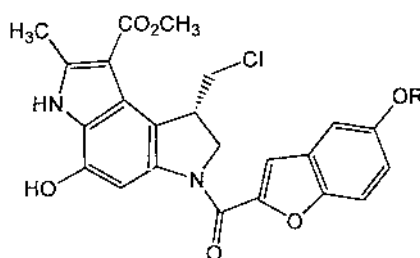
en la que D, L¹, L⁴, y X⁴ son como se han definido anteriormente y se describe adicionalmente en el presente documento, y H es un enlazador que comprende la estructura:



- 5 en la que n_1 es un número entero de 1 - 10; n_2 es 0, 1, o 2; cada R^{24} es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido; e I es bien un enlace (es decir, el enlace entre el átomo de carbono de la estructura principal y el nitrógeno adyacente) o:



- 10 en el que n_3 es 0 o 1, con la condición de que cuando $n_3 = 0$, n_2 no es 0; y n_4 es 1, 2, o 3, en la que cuando I es un enlace, n_1 es 3 y n_2 es 1, D no puede ser

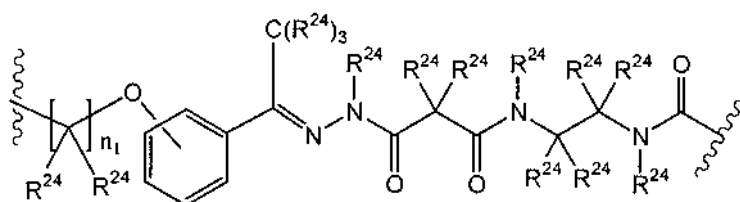


- 15 donde R es Me o $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NMe}_2$.

- En una realización, la sustitución en el anillo de fenilo es una sustitución en para. En realizaciones preferidas, n_1 es 2, 3, o 4 o n_1 es 3. En realizaciones preferidas, n_2 es 1. En realizaciones preferidas, I es un enlace (es decir, el enlace entre el átomo de carbono de la estructura principal y el nitrógeno adyacente). En un aspecto, el enlazador de hidrazina, H, puede formar un enlazador de 6 miembros autoinmolable tras la escisión, por ejemplo, cuando n_3 es 0 y n_4 es 2. En otro aspecto, el enlazador de hidrazina, H, puede formar enlazadores de 5 miembros autoinmolables tras la escisión. En otros aspectos más, H forma un enlazador de 5 miembros autoinmolable, H forma un enlazador de 7 miembros autoinmolable, o H forma un enlazador de 5 miembros autoinmolable y un enlazador de 6 miembros autoinmolable, tras la escisión. La tasa de escisión se ve afectada por el tamaño del anillo formado tras la escisión. Por lo tanto, dependiendo de la tasa de escisión deseada, se puede seleccionar el tamaño adecuado del anillo a formar tras la escisión.

Enlazadores de hidrazina de cinco miembros

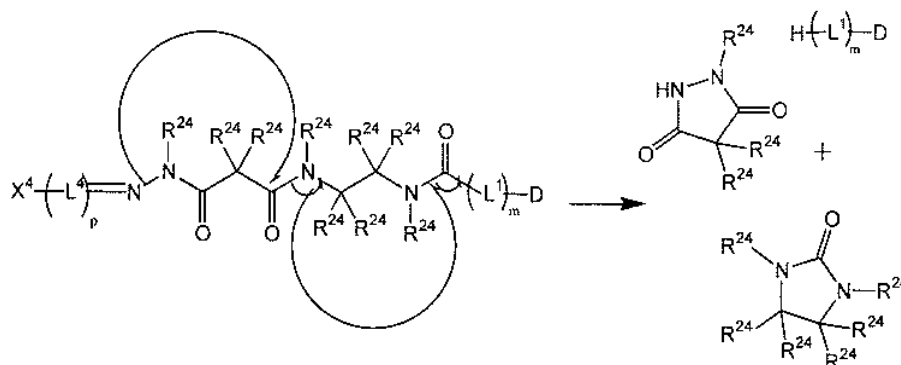
- 30 En una realización, el enlazador de hidrazina comprende un enlazador de hidrazina de 5 miembros, en la que H comprende la estructura:



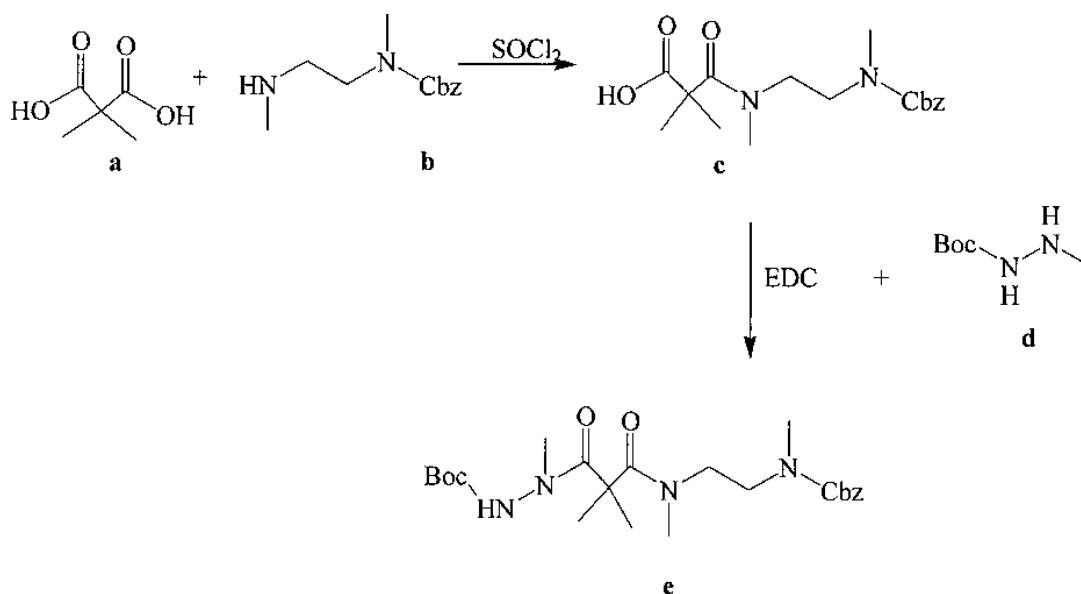
- 35 En una realización preferida, n_1 es 2, 3, o 4. En otra realización preferida, n_1 es 3.

En la estructura anterior, cada R^{24} es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido. En una realización, cada R^{24} es independientemente H o un alquilo C_1 - C_6 . En otra realización, cada R^{24} es independientemente H o un alquilo C_1 - C_3 , más preferentemente H o CH_3 . En otra realización, al menos un R^{24} es un grupo metilo. En otra realización, cada R^{24} es H. Cada R^{24} se selecciona para adaptar los efectos estéricos de los compuestos y para alterar la solubilidad.

Los enlazadores de hidrazina de 5 miembros pueden experimentar una o más reacciones de ciclación que separan el fármaco del enlazador, y se pueden describir, por ejemplo, mediante:



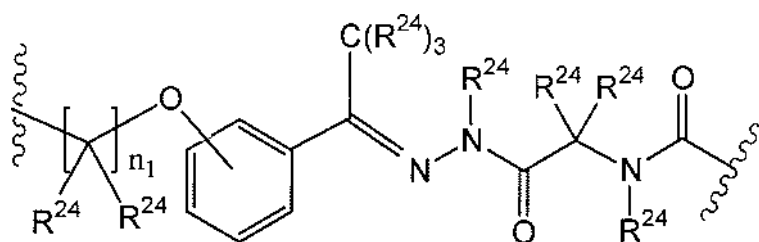
Una ruta de síntesis ilustrativa para preparar un enlazador de cinco miembros de la invención es:



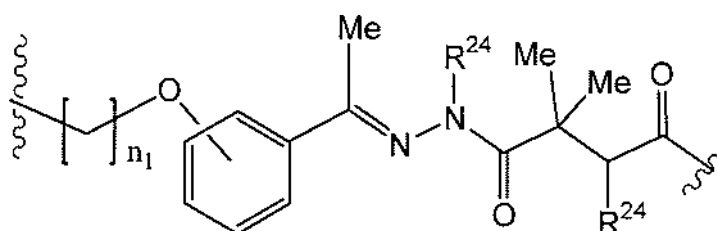
El DMDA **b** protegido con Cbz se puede hacer reaccionar con ácido 2,2-dimetil-malónico **a** en solución con cloruro de tionilo para formar un ácido Cbz-DMDA-2,2-dimetilmalónico **c**. El compuesto **c** se hace reaccionar con Boc-N-metil hidrazina **d** en presencia de EDC para formar DMDA-2,2-dimetilmalónico-Boc-N-metilhidrazina **e**.

Enlazadores de hidrazina de seis miembros

En otra realización, el enlazador de hidrazina comprende un enlazador de hidrazina de 6 miembros, en la que H comprende la estructura:

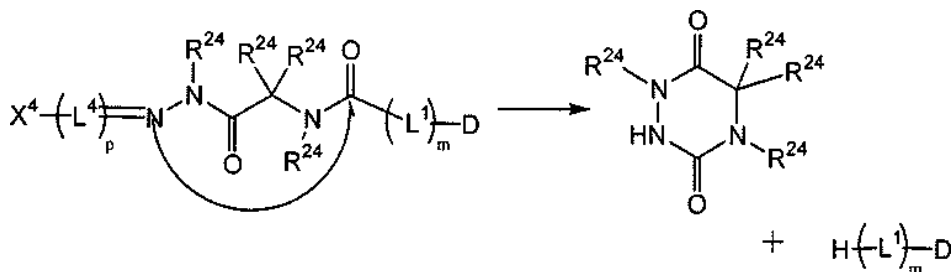


En una realización preferida, n_1 es 3. En la estructura anterior, cada R^{24} es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido. En una realización, cada R^{24} es independientemente H o un alquilo C_1-C_6 . En otra realización, cada R^{24} es independientemente H o un alquilo C_1-C_3 , más preferentemente H o CH_3 . En otra realización, al menos un R^{24} es un grupo metilo. En otra realización, cada R^{24} es H. Cada R^{24} se selecciona para adaptar los efectos estéricos de los compuestos y para alterar la solubilidad. En una realización preferida, H comprende la estructura:

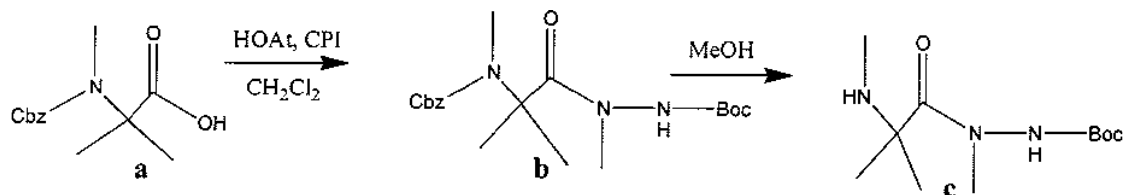


En una realización, H comprende una sustitución con dimetilo digeminal. En una realización de la estructura anterior, cada R^{24} es independientemente: un H o un alquilo sustituido o no sustituido.

Los enlazadores de hidrazina de 6 miembros experimentarán una reacción de ciclación que separa el fármaco del enlazador, y se pueden describir como:



Una ruta de síntesis ilustrativa para preparar un enlazador de seis miembros de la invención es:

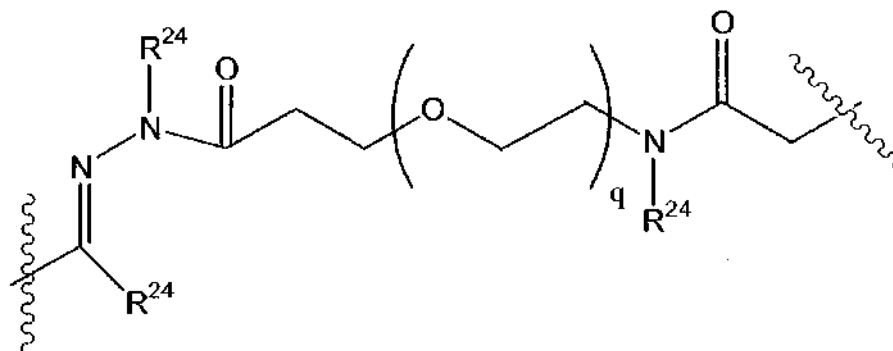


Dimetil alanina protegida con Cbz **a** en solución con diclorometano, se hizo reaccionar con HOAt y CPI para formar una dimetilamina hidrazina protegida con Cbz **b**. La hidrazina **b** se desprotege por acción del metanol, formando el compuesto **c**.

Otros enlazadores de hidrazina

Se contempla que un enlazador tenga siete miembros. Probablemente, este enlazador no ciclaría tan rápidamente como los enlazadores de cinco o seis miembros, pero esto se puede preferir para algunos conjugados de anticuerpo-ligando. De manera similar, el enlazador de hidrazina puede comprender dos anillos de seis miembros o un enlazador de hidrazina que tenga un producto de ciclación de seis miembros y uno de cinco miembros. También se contemplan un enlazador de cinco y siete miembros, así como un enlazador de seis y siete miembros.

Otra estructura de hidrazina, H, tiene la fórmula::

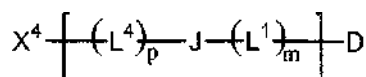


5 donde q es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y

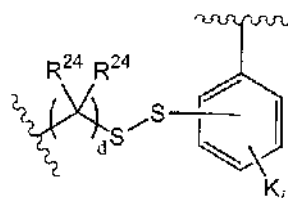
cada R^{24} es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido. Esta estructura de hidrazina también puede formar anillos de seis o siete miembros, y se pueden añadir componentes adicionales para formar múltiples anillos.

Enlazadores de disulfuro (J)

En otra realización más, el enlazador comprende un grupo disulfuro enzimáticamente escindible. En una realización, un compuesto anticuerpo-ligando citotóxico tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (d):



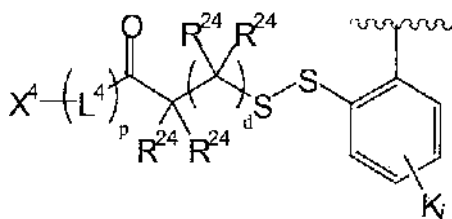
en la que D, L^1 , L^4 , y X^4 son como se han definido anteriormente y se describen adicionalmente en el presente documento, y J es un enlazador de disulfuro que comprende la estructura:



en la que cada R^{24} es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo no sustituido; cada K es un elemento seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCOR^{21}$, y OR^{21} en la que R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido y heterocicloalquilo no sustituido; i es un número entero de 0, 1, 2, 3, o 4; y d es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

El anillo aromático del enlazador de disulfuro se puede sustituir por uno o más grupos "K". Un grupo "K" es un sustituyente del anillo aromático que sustituye a un hidrógeno por otra parte unido a uno de los cuatro átomos de carbono no sustituidos que forman parte de la estructura del anillo. El grupo "K" puede ser un solo átomo, tal como un halógeno, o puede ser un grupo multiatómico, tal como alquilo, heteroalquilo, amino, nitro, hidroxilo, alcoxi, haloalquilo, y ciano. Los sustituyentes K ilustrativos incluyen independientemente, aunque no de forma limitativa, F, Cl, Br, I, NO_2 , OH, OCH_3 , $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ y metilo. Para " K_i ", i es un número entero de 0, 1, 2, 3, o 4. En una realización específica, i es 0.

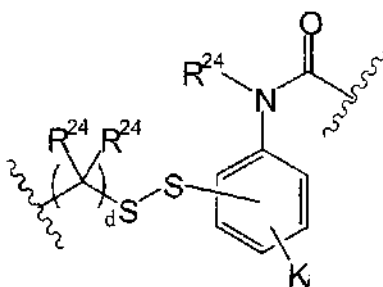
El enlazador comprende preferentemente un grupo disulfuro enzimáticamente escindible de la siguiente fórmula:



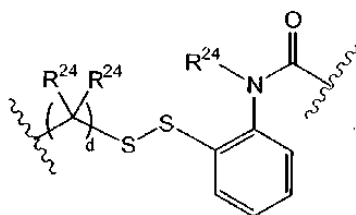
En esta realización, las identidades de L^4 , X^4 , p , y R^{24} son como se han descrito anteriormente, y d es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En una realización particular, d es 1 o 2.

5

En la fórmula siguiente se muestra un enlazador de disulfuro más específico:



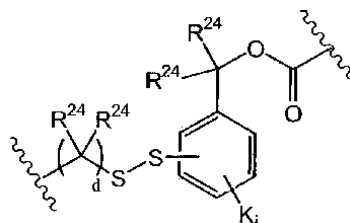
10 Un ejemplo específico de esta realización es el siguiente:



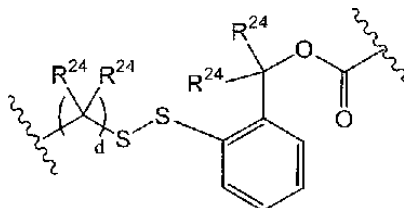
Preferentemente, d es 1 o 2,

15

En la fórmula siguiente se muestra otro enlazador de disulfuro:



20 Un ejemplo específico de esta realización es el siguiente:

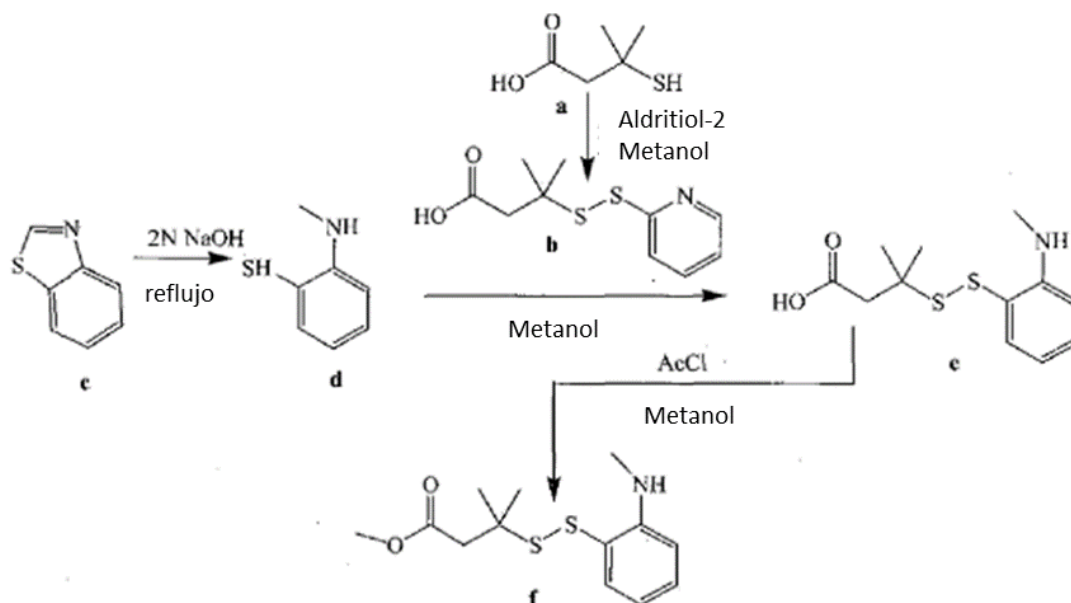


Preferentemente, d es 1 o 2.

25

En diversas realizaciones, los disulfuros son orto respecto a la amina. En otra realización específica, a es 0. R^{24} se selecciona preferentemente e independientemente entre H y CH_3 .

Una ruta de síntesis ilustrativa para preparar un enlazador de disulfuro de la invención es la siguiente:



- 5 Una solución de ácido 3-mercaptopropionico **a** se hace reaccionar con aldritol-2 para formar yoduro de 3-metil benzotiazolio **b**. El yoduro de 3-metil benzotiazolio **c** se hace reaccionar con hidróxido de sodio para formar el compuesto **d**. Una solución del compuesto **d** con metanol se hace reaccionar adicionalmente con el compuesto **b** para formar el compuesto **e**. El compuesto **e** es desprotegido por la acción de cloruro de acetilo y metanol forman el compuesto **f**.

10 Para un análisis adicional sobre los tipos de citotoxinas, enlazadores y otros métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véanse también la publicación PCT WO 2007/059404 de Gangwar et al. y titulada "Cytotoxic Compounds And Conjugates " Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Moléculas ligando

- 20 En un aspecto, la presente invención presenta el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención conjugado a una molécula ligando, en el que la molécula ligando es un agente terapéutico, tal como citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados también se denominan en el presente documento como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas reciben el nombre de "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las destruya).

Los ejemplos de moléculas ligando de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los ejemplos de moléculas ligando también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de moléculas ligando que se pueden conjugar con el anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de conjugado de calicamicina con anticuerpo está comercialmente disponible (Mylotarg®; American Home Products).

Los ejemplos preferidos de molécula ligando son CC-1065 y las duocarmicinas. CC-1065 se aisló por primera vez de *Streptomyces zelensis* en 1981 por la Upjohn Company (Hanka et al., J. Antibiot 31: 1211 (1978); Martin et al., J.

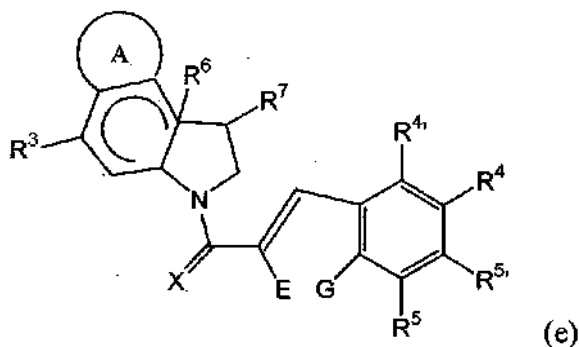
Antibiot. 33: 902 (1980); Martin et al., J. Antibiot. 34: 1119 (1981)) y se ha descubierto que tiene una potente actividad antitumoral u antimicrobiana tanto in vitro como en animales experimentales (Li et al., Cancer Res. 42: 999 (1982)). CC-1065 se une a ADN B bicatenario dentro de la hendidura menor (Swenson et al., Cancer Res. 42: 2821 (1982)) con preferencia de secuencia en 5'-d(A/GNTTA)-3' y 5'-d(AAAAA)-3' y alquila la posición N3 de la 3'-adenina en su unidad CPI de la izquierda presente en la molécula (Hurley et al., Science 226: 843 (1984)). A pesar de su potente y amplia actividad antitumoral, CC-1065 no se puede utilizar en seres humanos porque causa la muerte retrasada en animales experimentales.

Se conocen en la técnica muchos análogos y derivados de CC-1065 y de las duocarmicinas. Se ha revisado la investigación sobre la estructura, síntesis, y propiedades de muchos de los compuestos. Véanse, por ejemplo, Boger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 1438 (1996); y Boger *et al.*, *Chem. Rev.* 97: 787 (1997).

Un grupo de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. ha preparado numerosos derivados de CC-1065. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.101.038; 5.641.780; 5.187.186; 5.070.092; 5.703.080; 5.070.092; 5.641.780; 5.101.038; y 5.084.468; y la solicitud PCT publicada, WO 96/10405 y la solicitud europea publicada 0 537 575 A1.

La Upjohn Company (Farmacia Upjohn) también ha dedicado actividad a preparar derivados de CC-1065. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.739.350; 4.978.757, 5.332.837 y 4.912.227.

Se describe que un compuesto citotóxico tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula (e):



en la que el sistema del anillo A es un miembro seleccionado entre grupos arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. Los sistemas de anillo ilustrativo incluyen fenilo y pirrol.

Los símbolos E y G se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, un enlace simple, o E y G se unen opcionalmente para formar un sistema de anillo seleccionado entre arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

El símbolo X representa un miembro seleccionado entre O, S y NR²³. R²³ es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo.

El símbolo R³ representa un miembro seleccionado entre (=O), SR¹¹, NHR¹¹ y OR¹¹, en el que R¹ es H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, C(O)R¹², R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹², R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹², R¹³, SR¹² o SiR¹², R¹³, R¹⁴. Los símbolos R¹², R¹³, y R¹⁴ representan independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, donde R¹² y R¹³ junto con el átomo de nitrógeno o de carbono al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos. Uno o más de R¹², R¹³, o R¹⁴ pueden incluir un grupo escindible dentro de su estructura.

R⁴, R^{4'}, R⁵ y R^{5'} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, NO₂, NR¹⁵R¹⁶, NC(O)R¹⁵, OC(O)NR¹⁵R¹⁶, OC(O)OR¹⁵, C(O)R¹⁵, SR¹⁵, OR¹⁵, CR¹⁵=NR¹⁶, y O(CH₂)_nN(CH₃)₂, donde n es un número entero de 1 a 20, o cualquier par adyacente de R⁴, R^{4'}, R⁵ y R^{5'}, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, se unen para formar un sistema de anillo de cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros. R¹⁵ y R¹⁶ independientemente representan H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptídico sustituido o no sustituido, donde R¹⁵ y R¹⁶ junto con

el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos. Una estructura ilustrativa es anilina.

- 5 R^4 , $R^{4'}$, R^5 , $R^{5'}$, R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} y R^{16} contienen opcionalmente uno o más grupos escindibles dentro de su estructura, tal como un enlazador escindible o un sustrato escindible. Los grupos escindibles ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, péptidos, aminoácidos, hidrazinas, disulfuros, y derivados de cefalosporina.

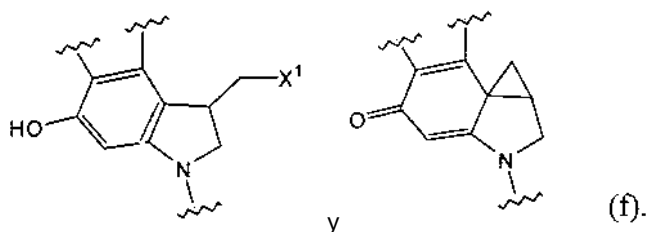
- 10 En algunas realizaciones, al menos uno de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , $R^{5'}$, R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} y R^{16} se usa para unir el fármaco a un enlazador o sustrato escindible por enzima, como se describe en el presente documento, por ejemplo, a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 , o J.

- 15 En otra realización adicional ilustrativa, al menos uno de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , $R^{5'}$, R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} y R^{16} contiene un grupo reactivo adecuado para conjugar el compuesto. En una realización ilustrativa adicional, R^4 , $R^{4'}$, R^5 , $R^{5'}$, R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido y heteroalquilo sustituido y tiene un grupo funcional reactivo en los extremos libres del resto alquilo o heteroalquilo. Uno o más de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , $R^{5'}$, R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} y R^{16} se pueden conjugar a otra especie, *por ejemplo*, agente de direccionamiento, marca detectable, soporte sólido, etc.

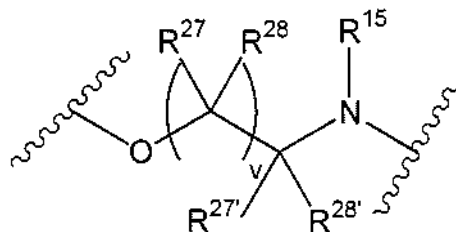
- 20 R^6 es un enlace simple que está presente o ausente. Cuando R^6 está presente, R^6 y R^7 se unen para formar un anillo de ciclopropilo. R^7 es CH_2-X^1 o $-CH_2-$. Cuando R^7 es $-CH_2-$ es un componente del anillo de ciclopropano. El símbolo X^1 representa un grupo saliente tal como un halógeno, por ejemplo Cl, Br o F. Las combinaciones de R^6 y R^7 se interpretan de forma que no se incumplan los principios de la valencia química.

- 25 X^1 puede ser cualquier grupo saliente. Los grupos salientes útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, halógenos, azidas, ésteres sulfónicos (por ejemplo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo), iones oxonio, percloratos de alquilo, ésteres de amonio alcanosulfonato, alquilfluorosulfonatos, y compuestos fluorados (por ejemplo, triflatos, nonaflatos, tresilatos) y similares. Los halógenos particulares útiles como grupos salientes son F, Cl y Br. La elección de estos y otros grupos salientes adecuados para un conjunto concreto de condiciones de reacción está entre las capacidades del experto en la materia (véanse, por ejemplo, March J, Advanced Organic Chemistry, 2.^a edición, John Wiley and Sons, 1992; Sandler SR, Karo W, Organic Functional Group Preparations, 2.^a edición, Academic Press, Inc., 1983; y Wade LG, Compendium of Organic Synthetic Methods, John Wiley and Sons, 1980).

- 35 La línea curvada dentro del anillo de seis miembros indica que el anillo puede tener uno o más grados de insaturación, y puede ser aromático. Por lo tanto, las estructuras de anillo tales como las definidas a continuación, y estructuras relacionadas, están dentro del alcance de la Fórmula (f):



- 40 En algunas realizaciones, al menos uno de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , y $R^{5'}$ une dicho fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 , e incluye

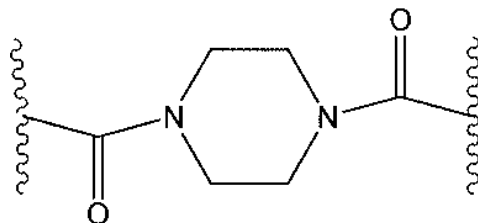


- 45 donde v es un número entero de 1 a 6; y cada R^{27} , $R^{27'}$, R^{28} , y $R^{28'}$ se selecciona independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R^{27} , $R^{27'}$, R^{28} , y $R^{28'}$ son todos H. En algunas realizaciones, v es un número entero de 1 a 3 (preferentemente, 1). Esta unidad se puede utilizar para separar los sustituyentes arilo del fármaco, y de esta forma resistir o evitar generar compuestos que sean sustratos para resistencia multifármaco.

50

En una realización, R^{11} incluye un resto, X^5 , que se autocicla y une el fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 . El resto, X^5 , se puede escindir preferentemente usando una enzima y, cuando se escinde, proporciona el fármaco activo. Como ejemplo, R^{11} puede tener la siguiente estructura (donde el lado derecho se acopla a lo que queda del fármaco):

5

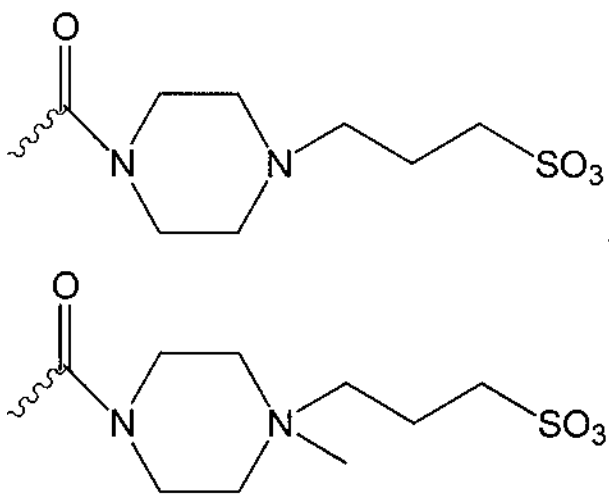


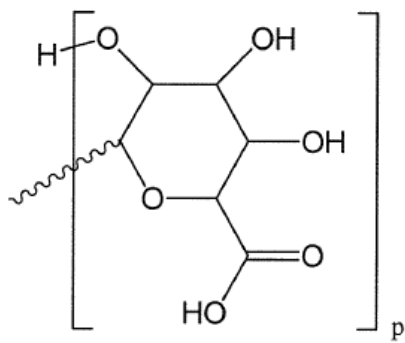
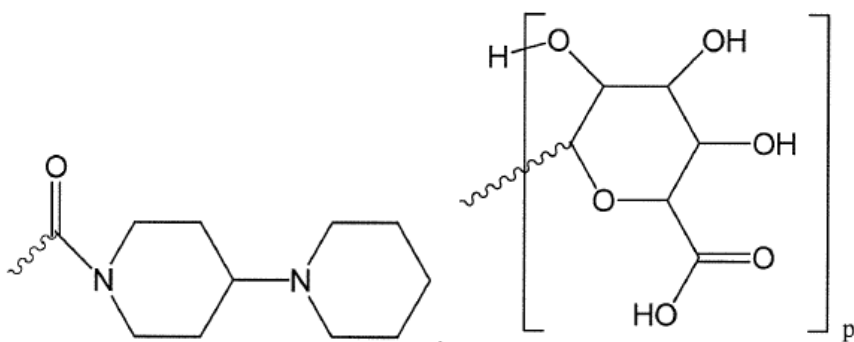
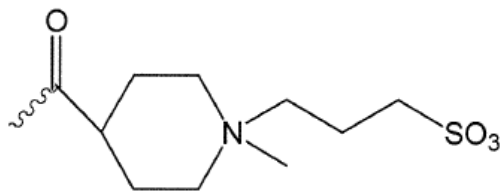
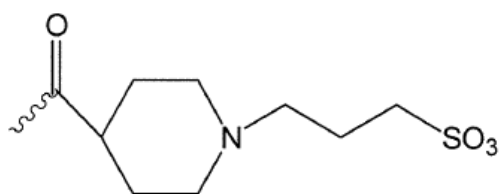
En una realización ilustrativa, el sistema de anillo A de fórmula (e) es un anillo de fenilo sustituido o no sustituido. El sistema de anillo A puede estar sustituido con uno o más sustituyentes del grupo arilo como se define en la sección de definiciones del presente documento. En algunas realizaciones, el anillo de fenilo está sustituido con uno resto CN o metoxi.

10

En algunas realizaciones, al menos uno de R^4 , R^4 , R^5 , y R^5 une dicho fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 , y R^3 se selecciona entre SR^{11} , NHR^{11} y OR^{11} . R^{11} se selecciona entre $-SO(OH)_2$, $-PO(OH)_2$, $-AA_n$, $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$, $-C(O)OPhNH(AA)_m$,

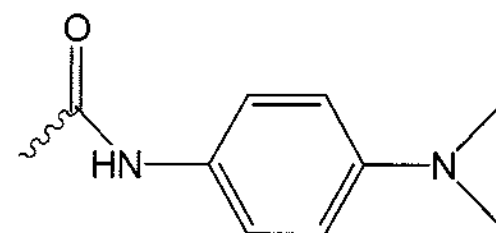
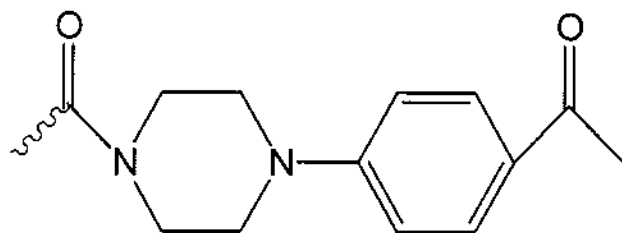
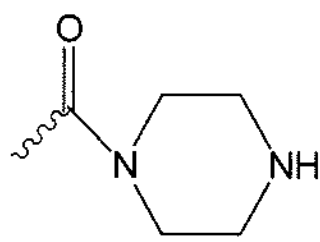
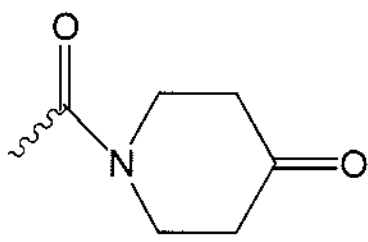
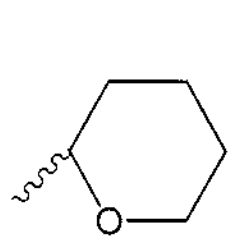
15





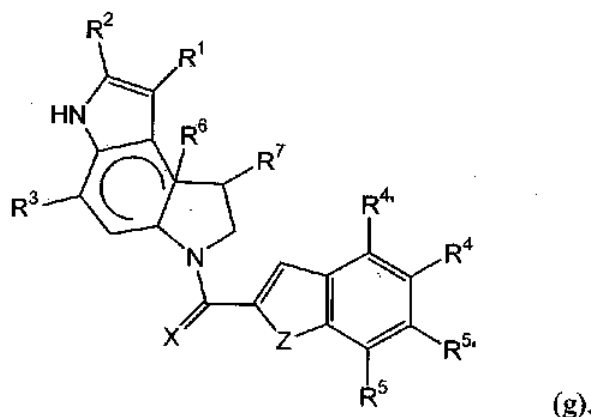
combinación de azúcares,

o cualquier otro azúcar o



sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde n es cualquier número entero en el intervalo de 1 a 10, m es cualquier número entero en el intervalo de 1 a 4, p es cualquier número entero en el intervalo de 1 a 6, y AA es cualquier aminoácido natural o no natural. En algunas realizaciones, AA_n o AA_m se selecciona entre las mismas secuencias de aminoácidos descritas anteriormente para los enlazadores peptídicos (F) y opcionalmente es la misma que la secuencia de aminoácidos utilizada en la porción enlazadora de R⁴, R^{4'}, R⁵, o R^{5'}. En al menos algunas realizaciones, R³ es escindible *in vivo* para proporcionar un compuesto de fármaco activo. En al menos algunas realizaciones, R³ aumenta la solubilidad *in vivo* del compuesto. En algunas realizaciones, la tasa de disminución de la concentración del fármaco activo en la sangre es sustancialmente más rápida que la tasa de escisión de R³ para proporcionar el fármaco activo. Esto puede ser especialmente útil donde la toxicidad del fármaco activo es notablemente mayor que la de la forma de profármaco. En otras realizaciones, la tasa de escisión de R³ para proporcionar el fármaco activo es más rápida que la tasa de disminución de la concentración del fármaco activo en la sangre.

En otro compuesto ilustrativo tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (g):



- 5 En esta realización, las identidades de los sustituyentes R^3 , R^4 , R^4 , R^5 , R^5 , R^6 , R^7 y X son sustancialmente como se ha descrito anteriormente para la Fórmula (a), así como preferencias para realizaciones particulares. El símbolo Z es un elemento seleccionado independientemente de O, S y NR^{23} . El símbolo R^{23} representa un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo. Cada R^{23} se selecciona independientemente. El símbolo R^1 representa H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, o $C(O)R^8$ o CO_2R^8 . R^8 es un elemento seleccionado entre alquilo sustituido, alquilo no sustituido, NR^9R^{10} , NR^9NHR^{10} y OR^9 . R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R^2 es H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido. Se prefiere generalmente que cuando R^2 es alquilo sustituido, sea diferente a perfluoroalquilo, por ejemplo, CF_3 . En una realización, R^2 es un alquilo sustituido en el que la sustitución no es un halógeno. En otra realización, R^2 es un alquilo no sustituido.

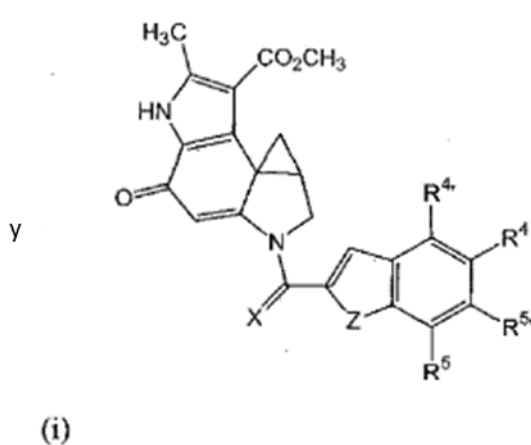
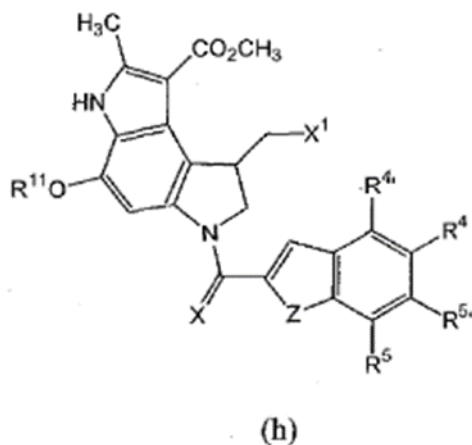
En algunas realizaciones, R^1 es un resto éster, tal como CO_2CH_3 . En algunas realizaciones, R^2 es un grupo alquilo inferior, que puede estar sustituido o no sustituido. Un grupo alquilo inferior actualmente preferido es CH_3 . En algunas realizaciones preferidas, R^1 es CO_2CH_3 y R^2 es CH_3 .

- 20 En algunas realizaciones, R^4 , R^4 , R^5 , y R^5 son miembros seleccionados independientemente entre H, halógeno, NH_2 , OMe, $O(CH_2)_2N(R^{29})_2$ y NO_2 . Cada R^{29} es independientemente H o alquilo inferior (por ejemplo, metilo).

En algunas realizaciones, el fármaco se selecciona de forma que el grupo saliente X^1 sea un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en halógeno, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, y azida. En algunas realizaciones, X^1 es F, Cl, o Br.

En algunas realizaciones, Z es O o NH. En algunas realizaciones, X es O.

Otros compuestos ilustrativos adicionales tienen una estructura de acuerdo con la Fórmula (h) o (i):

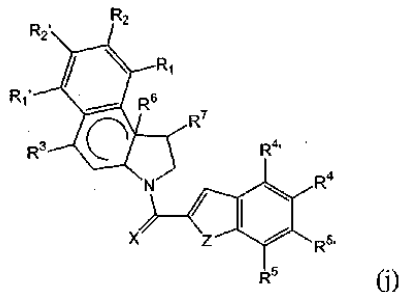


Otra estructura preferida para el análogo de duocarmicina de Fórmula (e) es una estructura en la que el sistema de anillo A es un anillo de fenilo sustituido o no sustituido. Los sustituyentes preferidos sobre la molécula de fármaco anteriormente descrita en el presente documento para la estructura de Fórmula 7 cuando el sistema de anillo A es

un pirrol son también sustituyentes preferidos cuando el sistema de anillo A es un anillo de fenilo sustituido o no sustituido.

Por ejemplo, el fármaco (D) comprende una estructura (j):

5



En esta estructura, R^3 , R^6 , R^7 , X son como se han descrito anteriormente para la Fórmula (e). Además, Z es un elemento seleccionado entre O, S y NR^{23} , en la que R^{23} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo;

10

R^1 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, $C(O)R^8$, o CO_2R^8 , en la que R^8 es un elemento seleccionado entre NR^9R^{10} y OR^9 , en donde R^9 y R^{10} son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

15

R^1 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, o $C(O)R^8$, en la que R^8 es un elemento seleccionado entre NR^9R^{10} y OR^9 , en donde R^9 y R^{10} son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

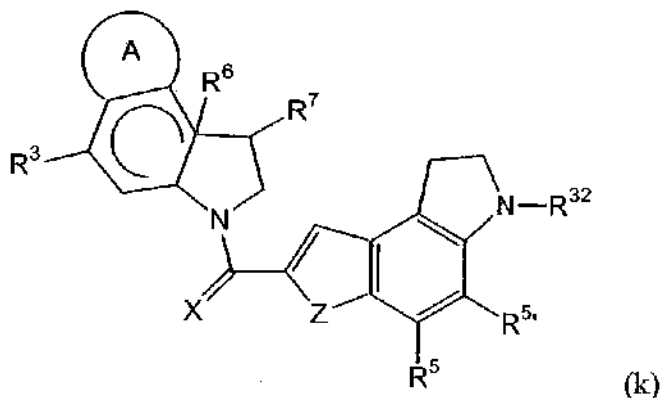
20

R^2 es H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido o heteroalquilo no sustituido o ciano o alcoxi; y $R^{2'}$ es H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido o heteroalquilo no sustituido.

Al menos uno de R^4 , R^4' , R^5 , R^5' , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} o R^{16} une el fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 .

25

Otro fármaco (D) comprende una estructura (k) donde R^4 y $R^{4'}$ se han unido para formar un heterocicloalquilo:



En esta estructura, R^3 , R^5 , R^5' , R^6 , R^7 , X son como se han descrito anteriormente para la Fórmula (e). Además, Z es un elemento seleccionado entre O, S y NR^{23} , en la que R^{23} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo;

30

R^{32} se selecciona entre Ff, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, donde n es un número entero de 1 a 20. R^{15} y R^{16} independientemente representan H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptidilo sustituido o no sustituido, donde R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos. R^{32} contiene opcionalmente uno o más grupos escindibles dentro de su estructura, tal como un enlazador escindible o un sustrato escindible. Los grupos escindibles ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, péptidos, aminoácidos, hidrazinas, disulfuros, y derivados de cefalosporina. Además,

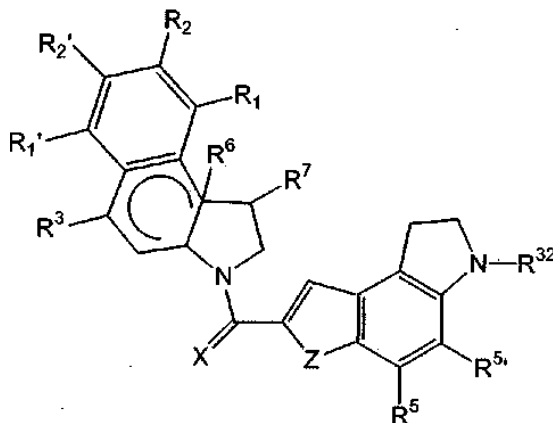
35

40

cualquier selección de sustituyentes descrita en el presente documento para R^4 , R^4' , R^5 , R^5' , R^{15} , y R^{16} es también aplicable a R^{32} .

Al menos uno de R^5 , R^5' , $R^{11'}$, R^{12} , R^{13} , R^{15} , R^{16} , o R^{32} une el fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 . En al menos algunas realizaciones, R^{32} une el fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 .

Un compuesto preferido es:

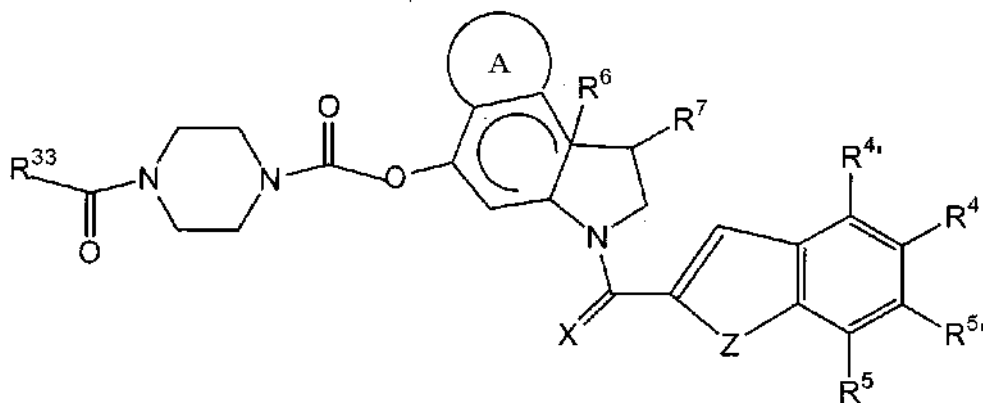


R^1 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, $C(O)R^8$, o CO_2R^8 , en la que R^8 es un elemento seleccionado entre NR^9R^{10} y OR^9 , en donde R^9 y R^{10} son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

R^1 es H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, o $C(O)R^8$, en la que R^8 es un elemento seleccionado entre NR^9R^{10} y OR^9 , en donde R^9 y R^{10} son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

R^2 es H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido o heteroalquilo no sustituido o ciano o alcoxi; y $R^{2'}$ es H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido o heteroalquilo no sustituido.

Un compuesto adicional tiene la fórmula:



En esta estructura, A, R^6 , R^7 , X, R^4 , R^4' , R^5 , y $R^{5'}$ son como se han descrito anteriormente para la Fórmula (e). Además, Z es un elemento seleccionado entre O, S y NR^{23} , donde R^{23} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo;

R^{33} se selecciona entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, donde n es un número entero de 1 a 20. R^{15} y R^{16} independientemente representan H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptidilo sustituido o no sustituido, donde R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos. R^{33} une el fármaco a L^1 , si está presente, o a F, H, J, o X^2 .

Preferentemente, A es un fenilo sustituido o no sustituido o un pirrol sustituido o no sustituido. Además, cualquier selección de sustituyentes descrita en el presente documento para R¹¹ es también aplicable a R³³.

Ligandos

X⁴ representa un ligando seleccionado entre el grupo que consiste de grupos funcionales reactivos protegidos, grupos funcionales reactivos no protegidos, etiquetas detectable, y agentes de direccionamiento. Los ligandos preferidos son agentes de direccionamiento, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos.

En algunas realizaciones, el grupo X⁴ se puede describir como un miembro seleccionado entre R²⁹, COOR²⁹, C(O)NR²⁹, y C(O)NNR²⁹ en la que R²⁹ es un elemento seleccionado entre alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. En otra realización ilustrativa adicional, R²⁹ es un elemento reactivo con tiol. En una realización ilustrativa adicional, R²⁹ es un elemento reactivo con tiol seleccionado entre derivados de haloacetilo y haluros de alquilo, maleimidias, aziridinas, y derivados de acrilóilo. El elemento reactivo con tiol anterior puede actuar como grupos protectores reactivos que se pueden hacer reaccionar con, por ejemplo, una cadena lateral de un aminoácido de un agente de direccionamiento, tal como un anticuerpo, para unir de esta forma el agente de direccionamiento al resto enlazador-fármaco.

Marcas detectables

La marca o grupo detectable particular que se puede utilizar junto con los compuestos y métodos de la invención no es generalmente un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la actividad o la utilidad del compuesto de la invención. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichas marcas detectables están bien desarrolladas en el campo de los inmunoensayos y, en general, la mayoría de las posibles marcas útiles en dichos métodos se pueden aplicar a la presente invención. Por lo tanto, una marca es cualquier composición detectable por métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos, o químicos. Las marcas útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Tejas, rodamina, y similares), radiomarcas (por ejemplo ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, y otras habitualmente utilizadas en un ELISA), y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

La marca se puede acoplar directa o indirectamente a un compuesto de la invención de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia. Como se ha indicado anteriormente, se puede utilizar una amplia variedad de marcas, donde la selección de la marca depende de la sensibilidad necesaria, facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, instrumentación disponible, y provisiones de eliminación.

Cuando el compuesto de la invención está conjugado con una marca detectable, la marca es preferentemente un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en isótopos radioactivos, agentes fluorescentes, precursores de agentes fluorescentes, cromóforos, enzimas y combinaciones de los mismos. Se conocen bien en la técnica métodos para conjugar varios grupos con anticuerpos. Por ejemplo, una marca detectable que está frecuentemente conjugada con un anticuerpo es una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, y glucosa oxidasa.

Las marcas no radioactivas frecuentemente están unidas por medios indirectos. En general, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) está unida covalentemente a un componente del conjugado. Seguidamente, el ligando se que a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), que bien es detectable inherentemente o bien está unida covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

Los componentes de los conjugados de la invención también se pueden conjugar directamente con compuestos generadores de la señal, *por ejemplo*, mediante la conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcas serán principalmente hidrolasas, especialmente las fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidotasas, especialmente las peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazinadionas, *por ejemplo*, luminol. Para una revisión de varios sistemas productores de etiquetas o señales que se pueden usar, véase, la patente de Estados Unidos n.º 4.391.904.

Los medios para obtener marcas detectables son bien conocidas de los expertos en la materia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la marca es una marca radioactiva, los medios de detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en la autorradiografía. Cuando la marca es una marca fluorescente, se puede detectar por excitación del fluorocromo con la longitud de onda de la luz adecuada, y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, las marcas enzimáticas se pueden detectar proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y la detección

del producto de reacción resultante. Finalmente, las marcas colorimétricas simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado a la marca. Por lo tanto, en varios ensayos con tiras reactivas, el oro conjugado aparece frecuentemente de color rosa, mientras que diferentes perlas conjugadas aparecen con el color de la perla.

- 5 En la actualidad se prefieren las marcas fluorescentes porque tienen la ventaja de necesitar pocas precauciones de manipulación, y son adecuadas para técnicas de visualización de alto rendimiento (análisis óptico, incluida la digitalización de la imagen para el análisis en un sistema integrado que comprende un ordenador). Las marcas preferidas se caracterizan normalmente por uno o más de los siguientes rasgos: elevada sensibilidad, elevada estabilidad, bajo fondo, baja sensibilidad ambiental y elevada especificidad en el marcado. Muchas marcas
- 10 fluorescentes están comercialmente disponibles de la empresa química SIGMA (Saint Louis, MO), Molecular Probes (Eugene, OR), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como otras muchas fuentes comerciales que conoce el experto. Además, el experto en la materia reconocerá cómo seleccionar un fluoróforo adecuado para una
- 15 aplicación concreta y, si no está fácilmente disponible en el comercio, podrá sintetizar el fluoróforo necesario de novo o modificar sintéticamente compuestos fluorescentes comercialmente disponibles para conseguir la marca fluorescente deseada.
- 20 Además de fluoróforos de molécula pequeña, las proteínas fluorescentes naturales y análogos genomanipulados de dichas proteínas son útiles en la presente invención. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes de cnidarios (Ward *et al*, *Photochem. Photobiol.* 35:803-808 (1982); Levine *et al*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B:77-85 (1982)), proteína fluorescente amarilla de una cepa de *Vibrio fischeri* (Baldwin *et al*, *Biochemistry* 29:5509-15 (1990)), Peridina-clorofila del dinoflagelado *Symbiodinium* sp. (Morris *et al*, *Plant Molecular Biology* 24:673:77 (1994)), ficobiliproteínas de cianobacterias marinas, tal como *Synechococcus*, por ejemplo, ficoeritrina y ficocianina (Wilbanks *et al*, *J. Biol Chem.* 268:1226-35 (1993)), y similares.

En general, antes de formar la unión entre la citotoxina y el agente de direccionamiento (u otro agente) y, opcionalmente, el grupo separador, se activará al menos una de las funcionalidades químicas. El experto en la

30 técnica apreciará que varias funcionalidades químicas, incluidos los grupos hidroxilo, amino y carboxi, se pueden activar usando varios métodos y condiciones. Por ejemplo, un grupo hidroxilo de la citotoxina o agente de direccionamiento se puede activar mediante el tratamiento con fosgeno para formar el correspondiente cloroformiato, o p-nitrofenilcloroformiato par formar el correspondiente carbonato.

35 Un agente de direccionamiento ilustrativo incluye una funcionalidad de carboxilo. Los grupos carboxilo se pueden activar, por ejemplo, mediante conversión al correspondiente haluro de acilo o éster activo. Esta reacción puede llevarse a cabo según varias condiciones como se ilustra en March, más arriba, pp. 388-89. En una realización ilustrativa, el haluro de acilo se prepara por reacción del grupo que contiene carboxilo con cloruro de oxalilo. El agente activado se hacen reaccionar con una citotoxina o combinación de brazo citotoxina-enlazador para formar un

40 conjugado de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que el uso de los agentes de direccionamiento que contienen carboxilo es algo ilustrativo, y que agentes que tienen otros muchos grupos funcionales se pueden conjugar con los enlazadores descritos en el presente documento.

Grupos funcionales reactivos

45 Para mayor claridad de ilustración, el siguiente análisis se centra en la conjugación de una citotoxina con un agente de direccionamiento. El punto central ilustra una realización a partir de la cual, el experto en la técnica puede inferir rápidamente otras.

50 Los compuestos ilustrativos contienen un grupo funcional reactivo, que suele estar situado en una cadena de alquilo o heteroalquilo sustituida o no sustituida, permitiendo su fácil unión a otras especies. Una ubicación cómoda para el grupo reactivo es la posición final de la cadena.

Los grupos reactivos y las clases de reacciones son generalmente aquellos que son bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. El grupo funcional reactivo puede estar protegido o no protegido, y la naturaleza protegida del grupo se puede cambiar según métodos conocidos en la técnica de la síntesis orgánica. Las clases preferidas de reacciones disponibles para los Análogos de citoCitotoxina son los que tienen lugar en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo,

60 reacciones de enamina) y adiciones a múltiples enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se analizan en, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al*, *Modification of Proteins*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

65 Los tipos de reacción ilustrativos incluyen la reacción de grupos carboxilo y varios derivados de los mismos que

incluyen, aunque no de forma limitativa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acil imidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, alquilo, alqueno, alquino y ésteres aromáticos. Los grupos hidroxilo se pueden convertir en ésteres, éteres, aldehídos, etc.,. Los grupos haloalquilo se convierten en nuevas especies por reacción con, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, carbanion, o un ion alcóxido. Los grupos dienófilos (por ejemplo, maleimida) participan en reacciones de Diels-Alder. Los grupos aldehído o cetona se pueden convertir en iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o por mecanismos tales como reacciones de adición de Grignard o adición de alquil litio. Los haluros de sulfonilo reaccionan rápidamente con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas. Los grupos amina o sulfhidrilo, por ejemplo, se acilan, alquilan u oxidan. Los alquenos se pueden convertir en una gama de nuevas especies usando cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc. Los epóxidos reaccionan rápidamente con aminas y compuestos de hidroxilo.

Un experto en la materia apreciará rápidamente que muchas de estas uniones se pueden producir de diferentes formas y usando varias condiciones. Para la preparación de ésteres, véase, *por ejemplo*, March, más arriba en 1157; para los tioésteres, véase, March, más arriba en 362-363, 491, 720-722, 829, 941, y 1172; para carbonatos, véase, March, más arriba en 346-347; para carbamatos, véase, March, más arriba en 1156-57; para amidas, véase, March, más arriba en 1152; para ureas y tioureas, véase, March, más arriba en 1174; para acetales y cetales, véase, Greene et al. más arriba 178-210 y March más arriba en 1146; para derivados de aciloalquilo, véase, Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, K. B. Sloan, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1992; para ésteres de enol, véase, March más arriba en 1160; para N-sulfonilimidatos, véase, Bundgaard et al., *J. Med. Chem.*, 31:2066 (1988); para anhídridos, véase, March más arriba en 355-56, 636-37, 990-91, y 1154; para N-acilamidas, véase, March, más arriba en 379; para bases de N-Mannich, véase, March más arriba en 800-02, y 828; para ésteres de hidroximetilcetona, véase, Petrcek et al. *Annals NY Acad. Sci.*, 507:353-54 (1987); para disulfuros, véase, March, más arriba en 1160; y para ésteres de fosfonato y fosfonamidas.

Los grupos funcionales reactivos se pueden desproteger y seleccionar de forma que no participen en, o interfieran con, las reacciones. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la materia entenderán cómo proteger un grupo funcional concreto de su interferencia con un conjunto de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

Normalmente, el agente de direccionamiento está unido covalentemente a una citotoxina utilizando técnicas químicas convencionales mediante sus correspondientes funcionalidades químicas. Opcionalmente, el enlazador o agente se acopla al agente mediante uno o más grupos separadores. Los grupos separadores pueden ser equivalentes o diferentes cuando se utilizan en combinación.

En general, antes de formar la unión entre la citotoxina y el grupo funcional reactivo y, opcionalmente, el grupo separador, se activará al menos una de las funcionalidades químicas. El experto en la técnica apreciará que varias funcionalidades químicas, incluidos los grupos hidroxilo, amino y carboxi, se pueden activar usando varios métodos y condiciones. Un grupo funcional reactivo comprende una funcionalidad de carboxilo. Los grupos carboxilo se pueden activar como se han descrito anteriormente en el presente documento.

Sustrato escindible

Los sustratos escindibles descritos en el presente documento se representan gráficamente como "X²". Preferentemente, el sustrato escindible es un sustrato escindible por enzima que se puede escindir mediante una enzima. Preferentemente, la enzima está preferentemente asociada, directa o indirectamente, con el tumor u otras células diana a tratar. La enzima se puede generar por el tumor o por otras células diana a tratar. Por ejemplo, el sustrato escindible puede ser un péptido que se puede escindir preferentemente por una enzima que se encuentra alrededor o en el tumor o en otra célula diana. De manera adicional o alternativa, la enzima puede estar unido a un agente de direccionamiento que se une específicamente a las células tumorales, tal como un anticuerpo específico de un antígeno tumoral.

Como ejemplos de sustratos escindibles por enzima para su acoplamiento a los fármacos anteriormente descritos, las publicaciones de solicitud de patente PCT con números WO 00/33888, WO 01/95943, WO 01/95945, WO 02/00263, y WO 02/100353, divulgan la unión de un péptido escindible a un fármaco. El péptido se puede escindir mediante una enzima, tal como una trouasa (tal como una thimet oligopeptidasa), CD 10 (neprilisina), una metaloproteasa de la matriz (tal como MMP2 o MMP9), una serina proteasa transmembrana de tipo II (tal como hepsina, testisina, TMPRSS4, o matriptasa/MT-SP1), o una cathepsina, asociada con el tumor. En esta realización, un profármaco incluye el fármaco que se ha descrito anteriormente, un péptido, un grupo estabilizante y, opcionalmente, un grupo enlazador entre el fármaco y el péptido. El grupo de estabilización está unido al extremo del péptido para proteger el profármaco de la degradación antes de llegar al tumor u otra célula diana. Los ejemplos de grupos estabilizantes adecuados incluyen ácidos nonamino, tales como el ácido succínico, ácido diglicólico, ácido maleico, polietilenglicol, ácido piroglutámico, ácido acético, ácido naftilcarboxílico, ácido tereftálico y ácido glutámico y derivados; así como aminoácidos no genéticamente codificados o ácido aspártico o ácido glutámico unidos al extremo N del péptido en el grupo β-carboxi del ácido aspártico o al grupo γ-carboxilo del ácido glutámico.

El péptido incluye de forma típica 3-12 (o más) aminoácidos. La selección de los aminoácidos concretos dependerá, al menos en parte, de la enzima que se va a usar para escindir el péptido, así como, la estabilidad del péptido *in vivo*. Un ejemplo de un péptido escindible adecuado es β -AlaLeuAlaLeu. Este se puede combinar con un grupo estabilizante para formar succinil- β -AlaLeuAlaLeu. Otros ejemplos de péptidos escindibles adecuados se

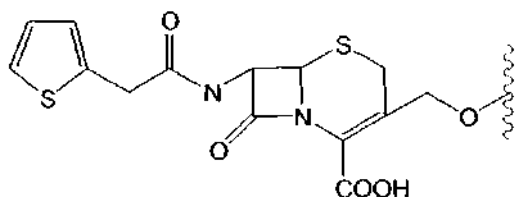
Como ejemplo ilustrativo, CD10, también conocido como neprilisina, endopeptidasa neutra (NEP), y antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (CALLA), es una metaloproteasa de tipo II de la superficial celular dependiente del cinc. Los sustratos escindibles adecuados para su uso con CD10 incluyen LeuAlaLeu y IleAlaLeu. Otros sustratos

Otro ejemplo ilustrativo se basa en las metaloproteasas de la matriz (MMP). Probablemente, las enzimas proteolíticas mejor caracterizadas asociadas con tumores, existe una correlación evidente de la activación de las MMPs en los microentornos tumorales. En particular, las enzimas solubles de la matriz MMP2 (gelatinasa A) y MMP9 (gelatinasa B), se han estudiado ampliamente, y se ha demostrado que se activan de forma selectiva durante la remodelación tisular, incluido el crecimiento tumoral. Las secuencias peptídicas diseñadas para escindirse mediante MMP2 y MMP 9 se han diseñado y sometido a ensayo para conjugados de dextrano y metotrexato (Chau *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 15:931-941 (2004)); PEG (polietilenglicol) y doxorubicina (Bae *et al.*, *Drugs Exp. Clin. Res.* 29:15-23 (2004)); y albúmina y doxorubicina (Kratz *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 11:2001-2006 (2001)). Los ejemplos de secuencias adecuadas para su uso con las MMP incluyen, aunque no de forma limitativa, ProValGlyLeulleGly (SEQ. ID NO. 102), GlyProLeuGlyVal (SEQ. ID NO. 103), GlyProLeuGlylleAlaGlyGln (SEQ. ID NO. 104), ProLeuGlyLeu (SEQ. ID NO. 105), GlyProLeuGlyMetLeuSerGln (SEQ. ID NO. 106), y GlyProLeuGlyLeuTrpAlaGln (SEQ. ID NO. 107). (Véanse, por ejemplo, las referencias citadas anteriormente así como Kline *et al.*, *Mol. Pharmaceut.* 1:9-22 (2004) y Liu *et al.*, *Cancer Res.* 60:6061-6067 (2000).) También se pueden usar otros sustratos escindibles.

Otro ejemplo más son las serina proteasas transmembrana de tipo II. Este grupo de enzimas incluye, por ejemplo, hepsina, testisina, y TMPRSS4. GlnAlaArg es una secuencia de sustrato que es útil con matriptasa/MT-SP1 (que se expresa en exceso en cánceres de mama y ovario) y LeuSerArg es útil con hepsina (que se expresa en exceso en cáncer de próstata y otros tipos de tumores). (Véanse, por ejemplo, Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:36720-36725 y Kurachi y Yamamoto, *Handbook of Proeolytic Enzymes Vol. 2*, 2ª edición (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, eds) pp. 1699-1702 (2004).) También se pueden usar otros sustratos escindibles.

Otro tipo de disposición de sustrato escindible incluye preparar una enzima independiente capaz de escindir el sustrato escindible que queda asociado con los tumores o células. Por ejemplo, una enzima se puede acoplar a un anticuerpo específico de tumor (u otra entidad que se atrae preferentemente hacia el tumor o hacia otra célula diana tal como un ligando del receptor) y, a continuación, el conjugado de enzima-anticuerpo se puede proporcionar al paciente. El conjugado de enzima-anticuerpo se dirige a, y se une con, antígeno asociado al tumor. Posteriormente, el conjugado de fármaco-sustrato escindible se proporciona al paciente como profármaco. El fármaco solamente se libera en la proximidad del tumor cuando el conjugado de fármaco-sustrato escindible interactúa con la enzima que ha quedado asociada con el tumor, de forma que el sustrato escindible se escinde, y el fármaco se libera. Por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.975.278; 5.587.161; 5.660.829; 5.773.435; y 6.132.722, divulgan una disposición de ese tipo. Los ejemplos de enzimas y sustratos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, β -lactamasa y derivados de cefalosporina, carboxipeptidasa G2 y derivados de glutámico y aspártico folato.

En una realización, el conjugado de enzima-anticuerpo incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se selecciona dependiendo de su especificidad por un antígeno expresado en una célula diana, o en un sitio diana, de interés. Se ha proporcionado anteriormente en el presente documento un análisis de los anticuerpos. Un ejemplo de un complejo cefalosporina-sustrato escindible es



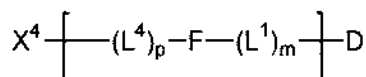
Ejemplos de conjugados

Los enlazadores y sustratos escindibles descritos en el presente documento se pueden usar en conjugados que contienen varias moléculas ligando. Se describen con más detalle a continuación algunos ejemplos de conjugados. Salvo que se indique otra cosa, los sustituyentes se definen como se ha expuesto anteriormente en las secciones

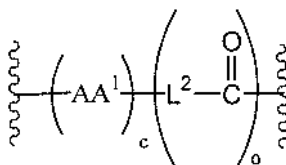
relativas a citotoxinas, enlazadores, sustratos escindibles.

A. Conjugados de enlazador

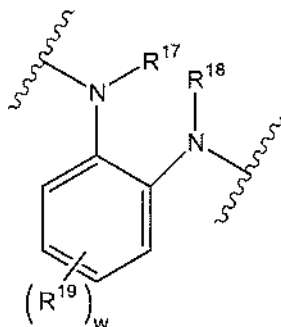
5 Un ejemplo de un conjugado adecuado es un compuesto de fórmula:



10 en la que L^1 es un enlazador autoinmolable; m es un número entero 0,1, 2, 3, 4, 5, o 6; F es un enlazador que comprende la estructura:

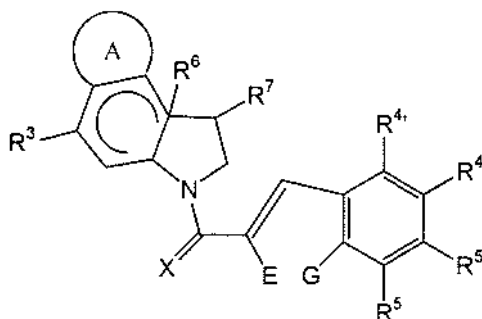


15 en la que AA^1 es uno o más elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en aminoácidos naturales y α -aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 a 20; L^2 es un enlazador autoinmolable y comprende



20 en la que cada R^{17} , R^{18} , y R^{19} se selecciona independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, y w es un número entero de 0 a 4; o es 1; L^4 es un elemento enlazador; p es 0 o 1; X^4 es un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en grupos funcionales reactivos protegidos, grupos funcionales reactivos no protegidos, etiquetas detectable, y agentes de direccionamiento; y D comprende una estructura:

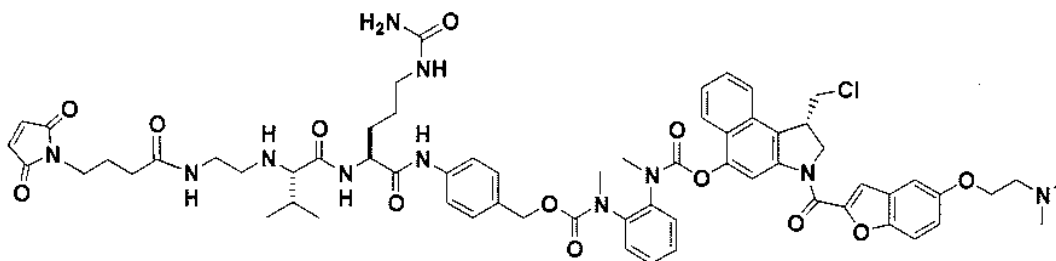
25



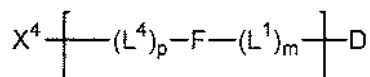
30 en la que el sistema del anillo A es un miembro seleccionado entre grupos arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; E y G son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, un enlace simple, o E y G se unen para formar un sistema de anillo seleccionado entre arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; X es un elemento seleccionado entre O, S y NR^{23} ; R^{23} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo; R^3 es OR^{11} , en el que R^{11} es un elemento seleccionado del grupo que
35 consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido,

monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, $C(O)R^{12}R^{13}$, $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $P(O)(OR^{12})_2$, $C(O)CHR^{12}R^{13}$, SR^{12} y $SiR^{12}R^{13}R^{14}$, R^4 , R^4 , R^5 y R^5 son elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^b$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, o cualquier par adyacente de R^4 , R^4 , R^5 y R^5 , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, se unen para formar un sistema de anillo de cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros; en la que n es un número entero de 1 a 20; R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptidilo sustituido o no sustituido, en la que R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; R^6 es un enlace simple que está presente o ausente y, cuando está presente, R^6 y R^7 se unen para formar un anillo de ciclopropilo; y R^7 es CH_2-X^1 o $-CH_2-$ unidos en dicho anillo de ciclopropilo con R^6 , en la que X^1 es un grupo saliente, en la que R^{11} une dicho fármaco a L^1 , si está presente, o a F.

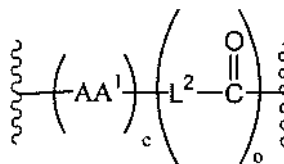
En algunas realizaciones, el fármaco tiene la estructura (c) o (f) anterior. Un ejemplo específico de un compuesto adecuado para su uso como conjugado es



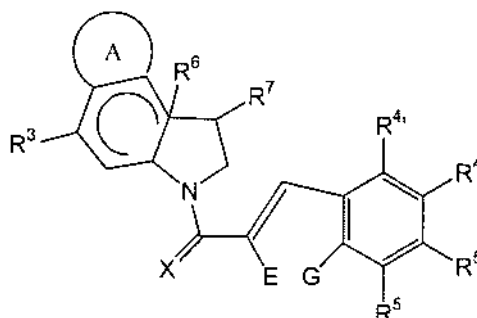
Otro ejemplo de un tipo de conjugado es un compuesto de fórmula



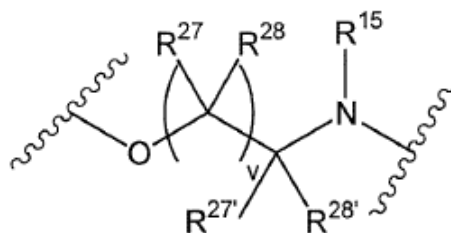
en la que L^1 es un enlazador autoinmolable; m es un número entero 0,1, 2, 3, 4, 5, o 6; F es un enlazador que comprende la estructura:



en la que AA^1 es uno o más elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en aminoácidos naturales y α -aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 a 20; L^2 es un enlazador autoinmolable; o es 0 o 1; L^4 es un elemento enlazador; p es 0 o 1; X^4 es un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en grupos funcionales reactivos protegidos, grupos funcionales reactivos no protegidos, etiquetas detectable, y agentes de direccionamiento; y D comprende una estructura:

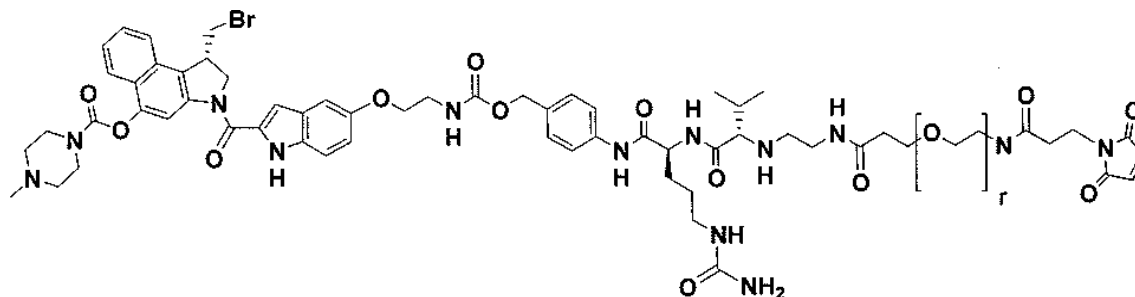


en la que el sistema del anillo A es un miembro seleccionado entre grupos arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; E y G son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, un enlace simple, o E y G se unen para formar un sistema de anillo seleccionado entre arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; X es un elemento seleccionado entre O, S y NR²³; R²³ es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo; R³ es un elemento seleccionado del grupo que consiste en (=O), SR¹¹, NHR¹¹ y OR¹¹, en el que R¹¹ es un elemento seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, C(O)R¹²R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹²R¹³, SR¹² y SiR¹²R¹³R¹⁴, en la que R¹², R¹³, y R¹⁴ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, en la que R¹² y R¹³ junto con el átomo de nitrógeno o de carbono al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; R⁴, R⁴, R⁵ y R⁵ son elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO₂, NR¹⁵R¹⁶, NC(O)R¹⁵, OC(O)NR¹⁵R¹⁶, OC(O)OR¹⁵, C(O)R¹⁵, SR¹⁵, OR¹⁵, CR¹⁵=NR¹⁶, y O(CH₂)_nN(CH₃)₂, o cualquier par adyacente de R⁴, R⁴, R⁵ y R⁵, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, se unen para formar un sistema de anillo de cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros, en la que n es un número entero de 1 a 20; R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptidilo sustituido o no sustituido, en la que R¹⁵ y R¹⁶ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; en la que al menos uno de R⁴, R⁴, R⁵ y R⁵ une dicho fármaco a L¹, si está presente, o a F, y comprende



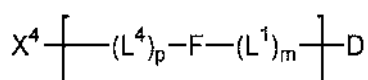
en la que v es un número entero de 1 a 6; y cada R²⁷, R^{27'}, R²⁸, y R^{28'} se selecciona independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; R⁶ es un enlace simple que está presente o ausente y, cuando está presente, R⁶ y R⁷ se unen para formar un anillo de ciclopropilo; y R⁷ es CH₂-X¹ o -CH₂-unidos en dicho anillo de ciclopropilo con R⁶, en la que X¹ es un grupo saliente.

En alguna realización, el fármaco tiene la estructura (c) o (f) anterior. Un ejemplo específico de un compuesto adecuado para su uso como conjugado es



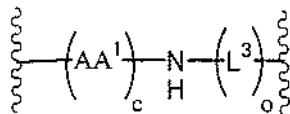
donde r es un número entero en el intervalo de 0 a 24.

Otro ejemplo de un conjugado adecuado es un compuesto de fórmula

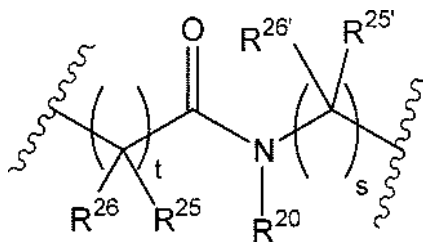


en la que L¹ es un enlazador autoinmolable; m es un número entero 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6; F es un enlazador que

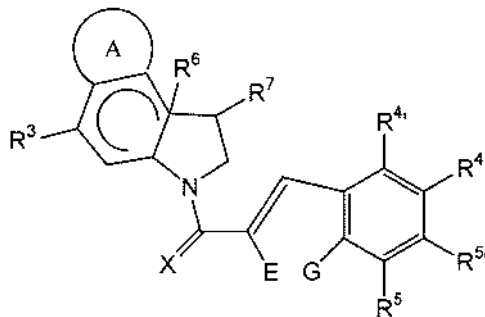
comprende la estructura:



- 5 en la que AA¹ es uno o más elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en aminoácidos naturales y α-aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 a 20; L³ es un grupo separador que comprende una amina primaria o secundaria, o un grupo funcional de carboxilo; en la que, cuando L³ está presente, m es 0 y cualquier amina de L³ forma un enlace amida con un grupo funcional de carboxilo colgante de D, o el carboxilo de L³ forma un enlace amida con un grupo funcional de amina de D; o es 0 o 1; L⁴ es un elemento enlazador, en la que L⁴ comprende



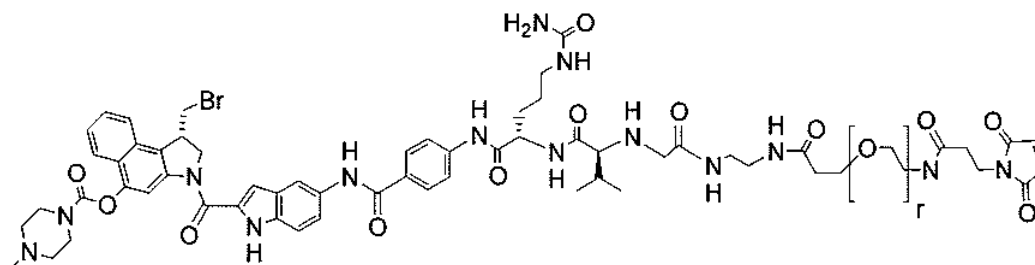
- 15 unido directamente al extremo N de (AA¹)_c, en la que R²⁰ es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo, cada R²⁵, R^{25'}, R²⁶, y R^{26'}, se selecciona independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y s y t son independientemente números enteros de 1 a 6; p es 1; X⁴ es un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en grupos funcionales reactivos protegidos, grupos funcionales reactivos no protegidos, etiquetas detectable, y agentes de direccionamiento; y D comprende una estructura:



- 25 en la que el sistema del anillo A es un miembro seleccionado entre grupos arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; E y G son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, un enlace simple, o E y G se unen para formar un sistema de anillo seleccionado entre arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; X es un elemento seleccionado entre O, S y NR²³; R²³ es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo; R³ es un elemento seleccionado del grupo que consiste en (=O), SR¹¹, NHR¹¹ y OR¹¹, en el que R¹¹ es un elemento seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, C(O)R¹²R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹²R¹³, SR¹² y SiR¹²R¹³R¹⁴, en la que R¹², R¹³, y R¹⁴ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, en la que R¹² y R¹³ junto con el átomo de nitrógeno o de carbono al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; R⁴, R^{4'}, R⁵ y R^{5'} son elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO₂, NR¹⁵R¹⁶, NC(O)R¹⁵, OC(O)NR¹⁵R¹⁶, OC(O)OR¹⁵, C(O)R¹⁵, SR¹⁵, OR¹⁵, CR¹⁵=NR¹⁶, y O(CH₂)_nN(CH₃)₂, o cualquier par adyacente de R⁴, R^{4'}, R⁵ y R^{5'}, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, se unen para formar un sistema de anillo de cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros, en la que n es un número entero de 1 a 20; R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido,

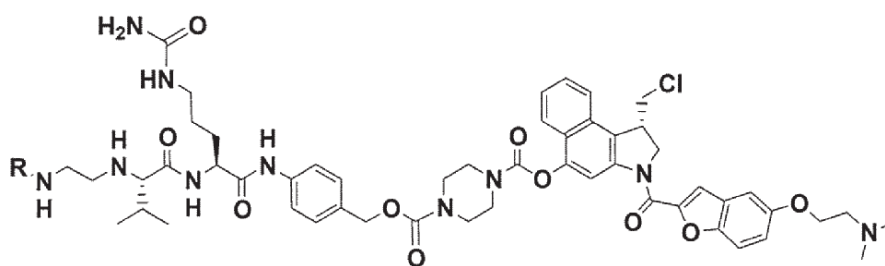
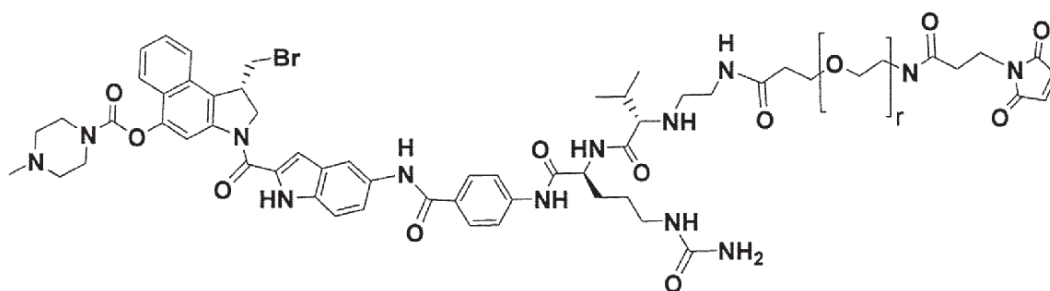
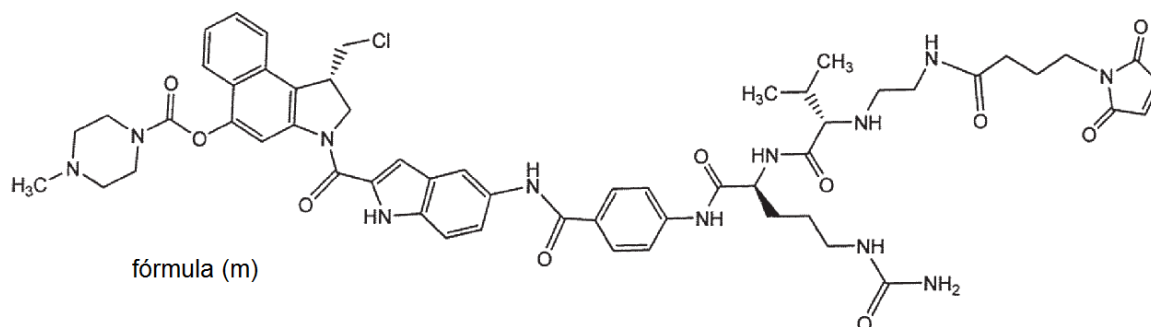
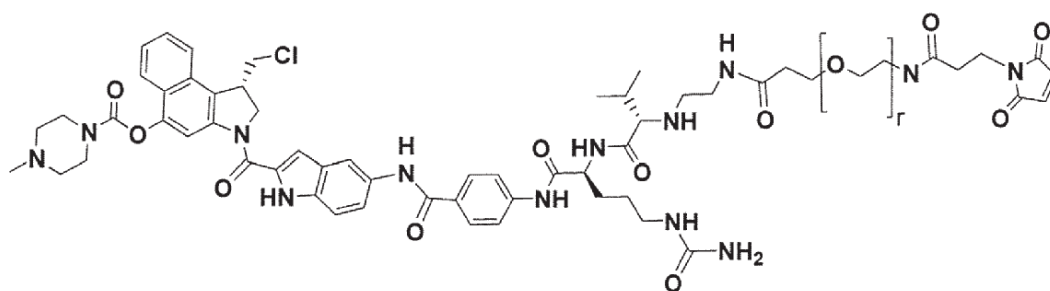
arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptidilo sustituido o no sustituido, en la que R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; R^6 es un enlace simple que está presente o ausente y, cuando está presente, R^6 y R^7 se unen para formar un anillo de ciclopropilo; y R^7 es $\text{CH}_2\text{-X}^1$ o $\text{-CH}_2\text{-}$ unidos en dicho anillo de ciclopropilo con R^6 , en la que X^1 es un grupo saliente, en la que al menos uno de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , $R^{5'}$, R^{15} o R^{16} une dicho fármaco a L^1 , si está presente, o a F.

En alguna realización, el fármaco tiene la estructura (c) o (f) anterior. Un ejemplo específico de un compuesto adecuado para su uso como conjugado es

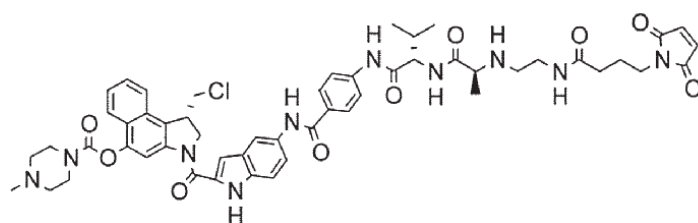
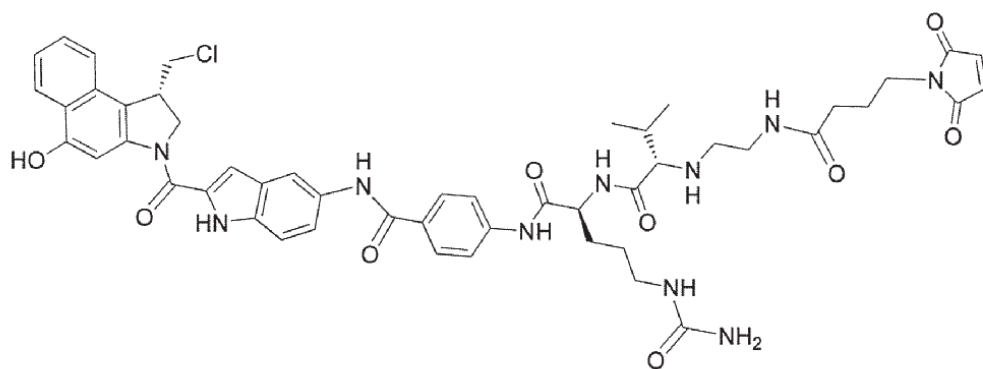
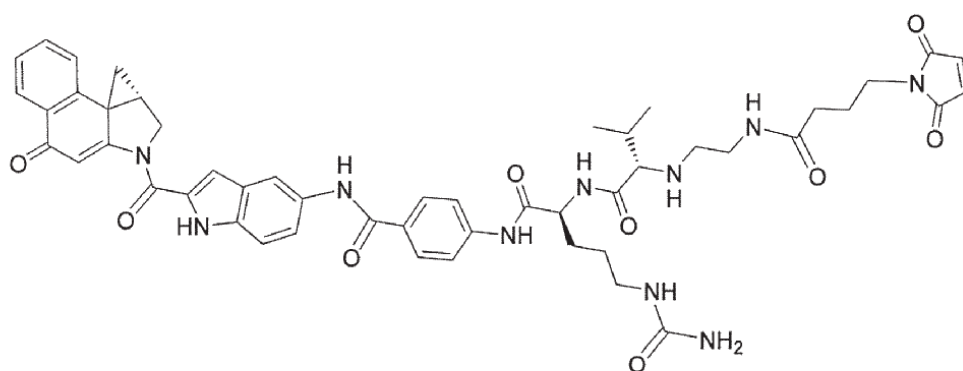
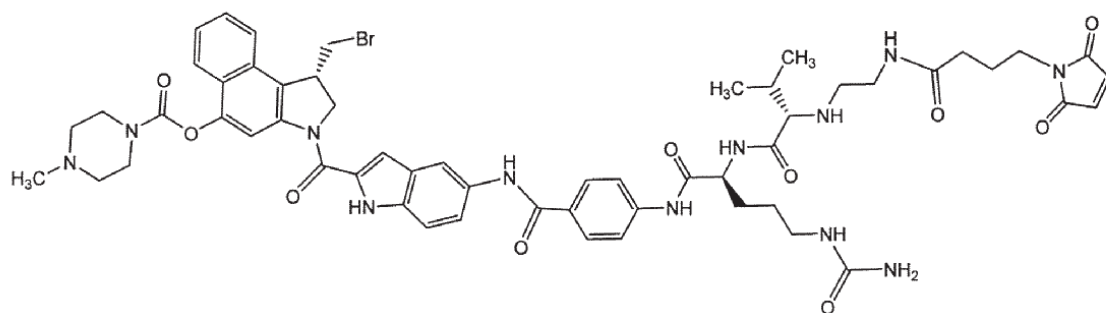


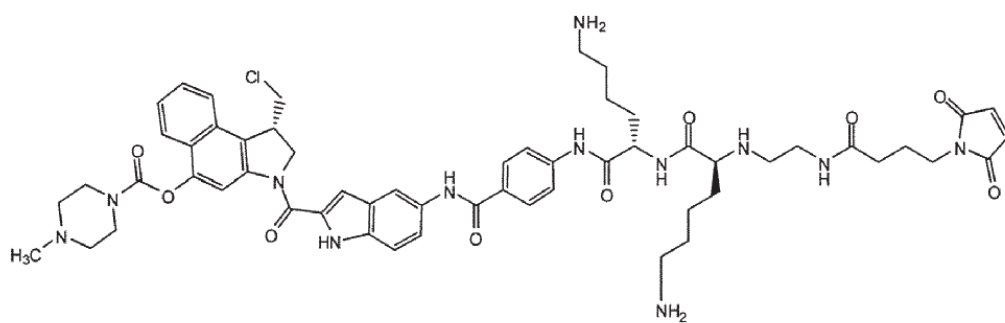
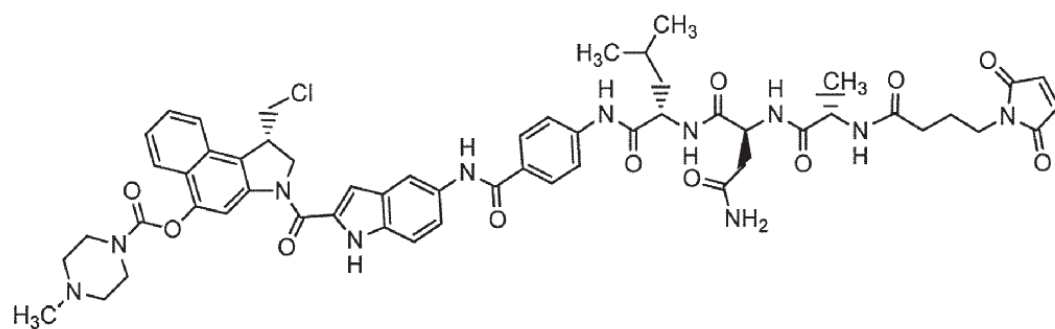
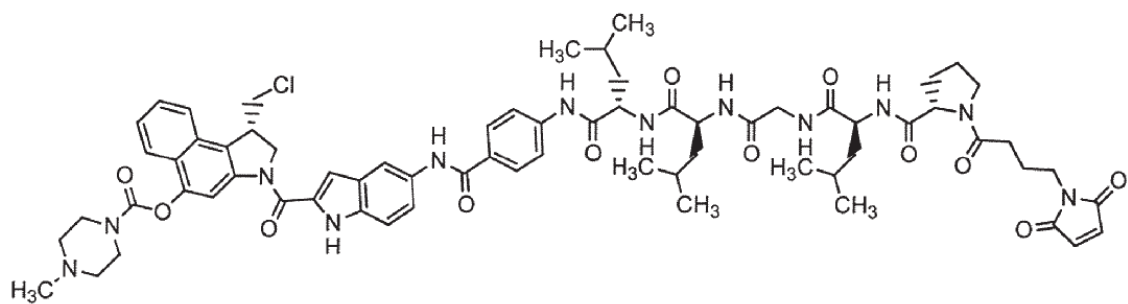
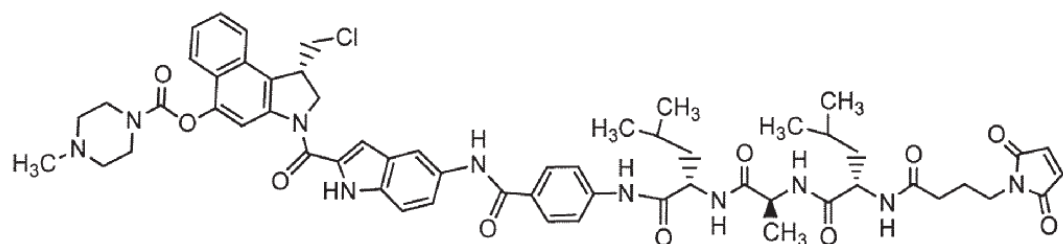
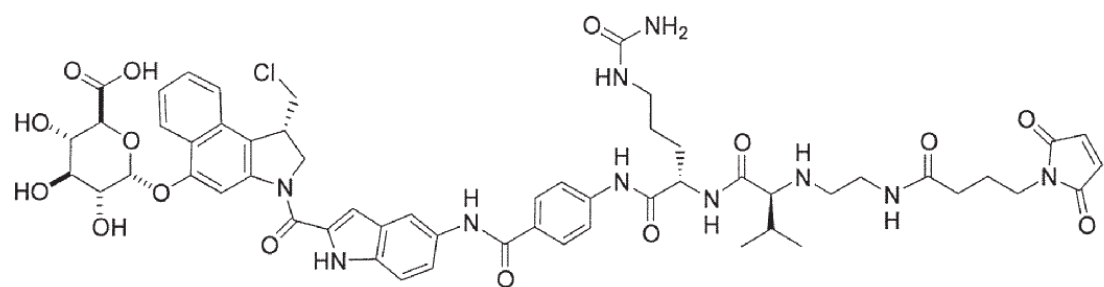
donde r es un número entero en el intervalo de 0 a 24.

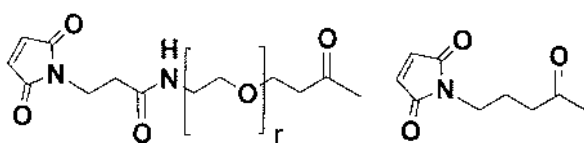
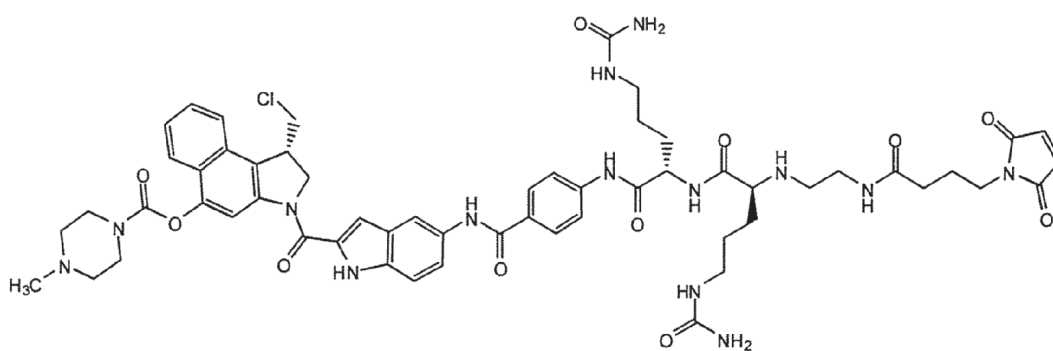
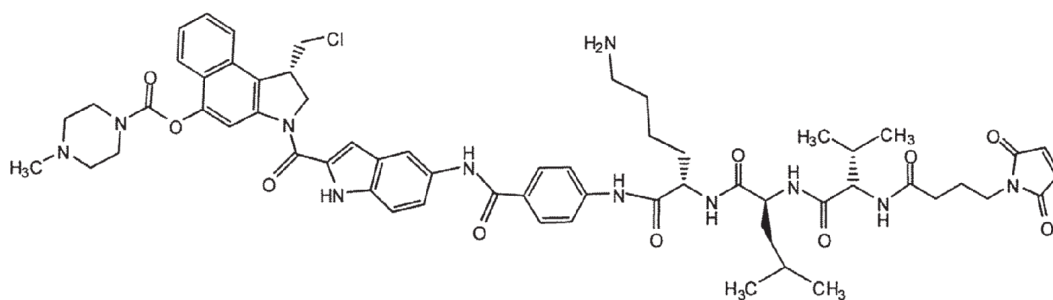
Otros ejemplos de compuestos adecuados para su uso como conjugados incluyen:



y





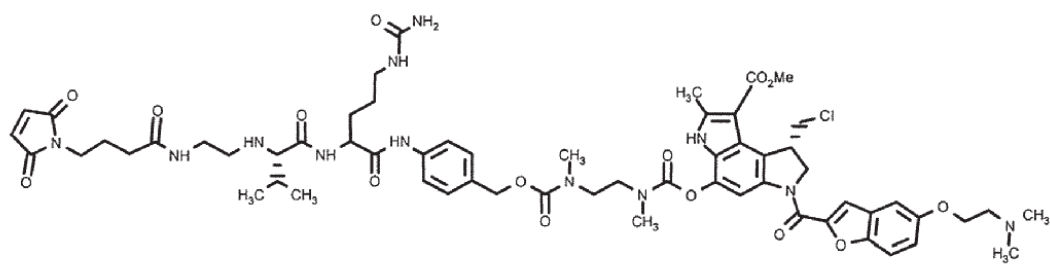
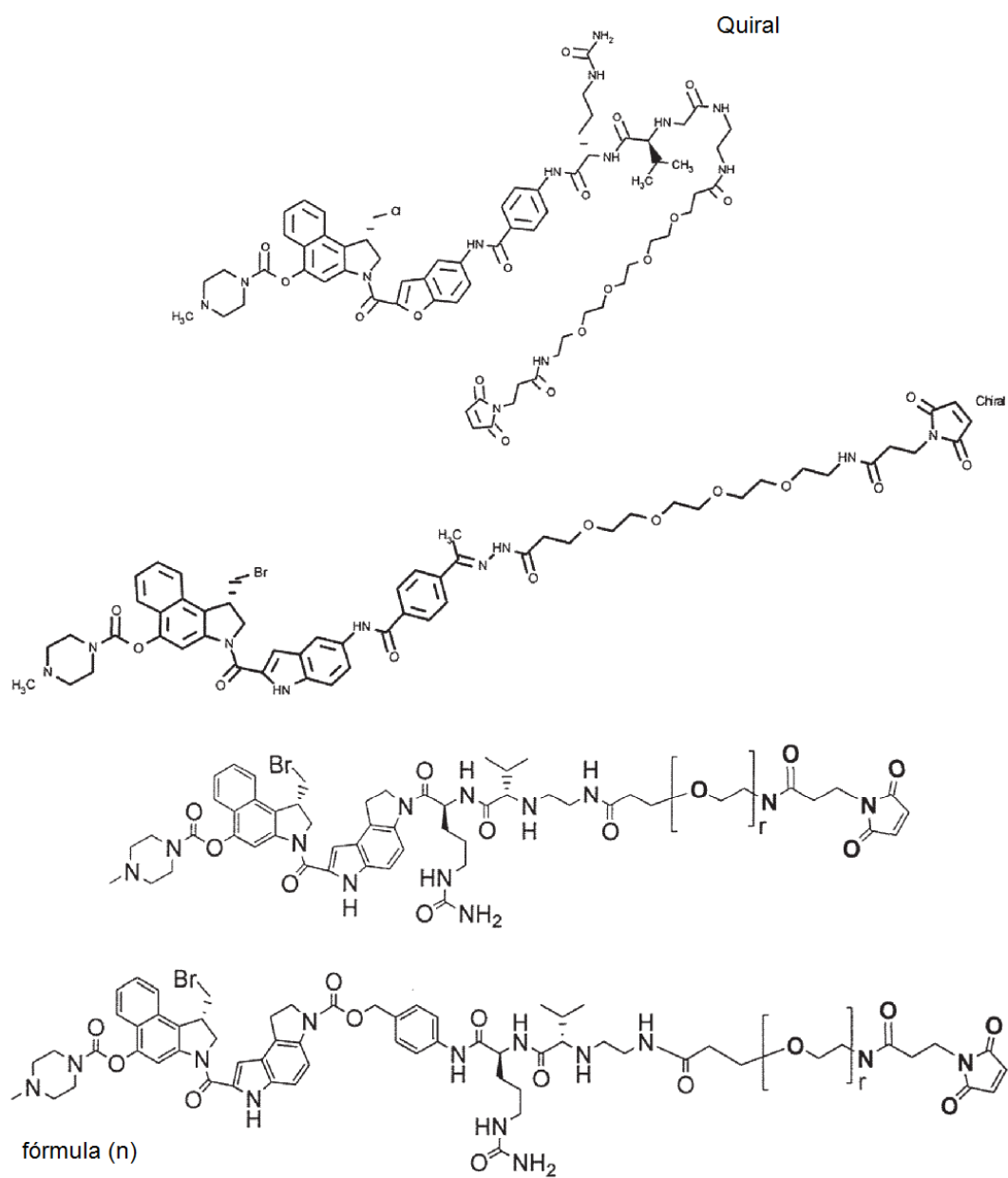


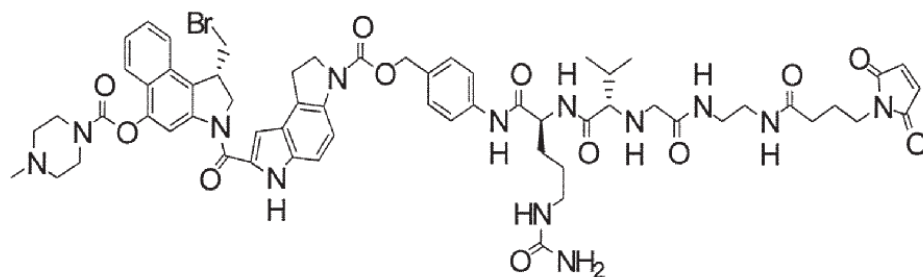
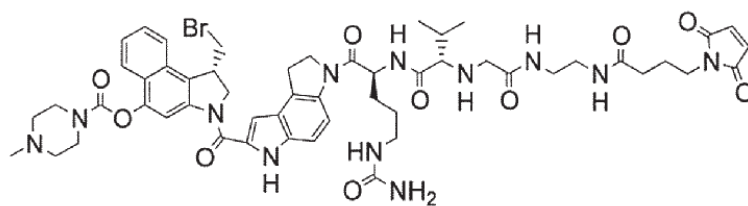
donde R es

o

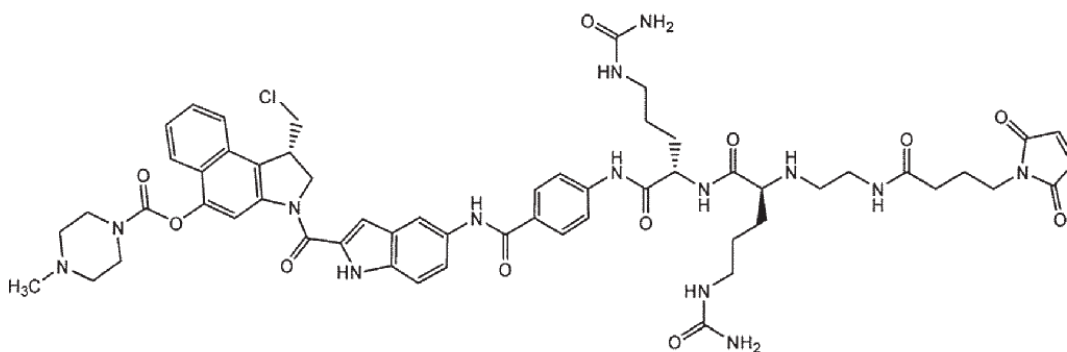
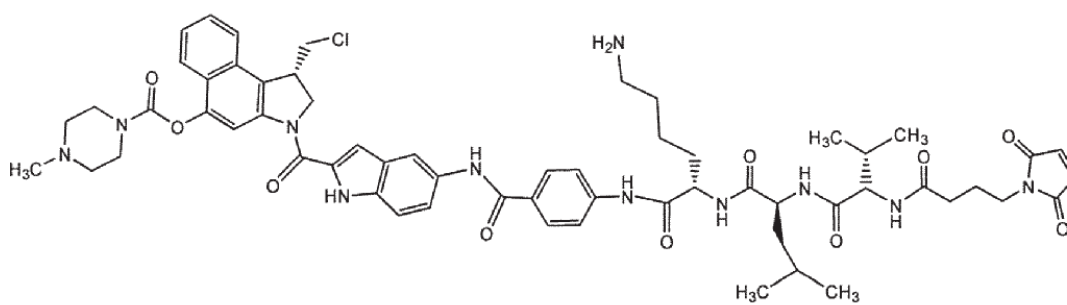
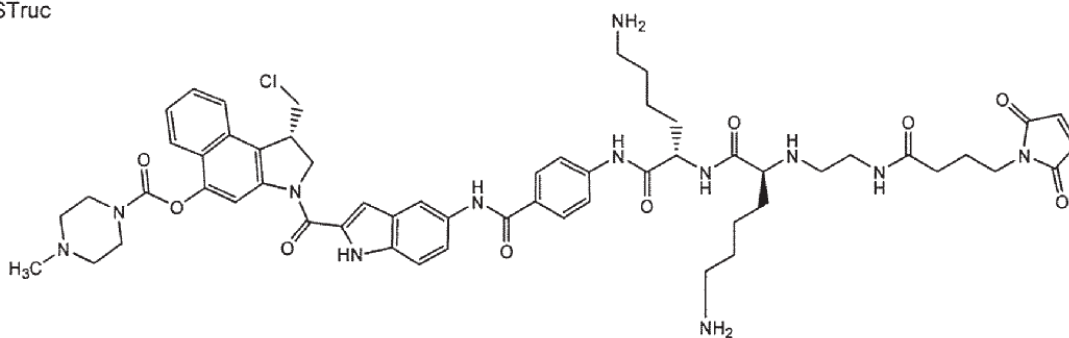
y r es un número entero en el intervalo de 0 a 24

5 También se pueden formar conjugados usando fármacos que tienen la estructura (g), tales como los siguientes compuestos:



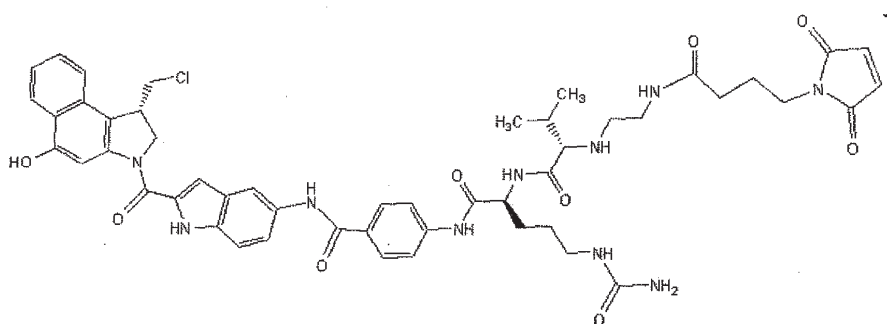
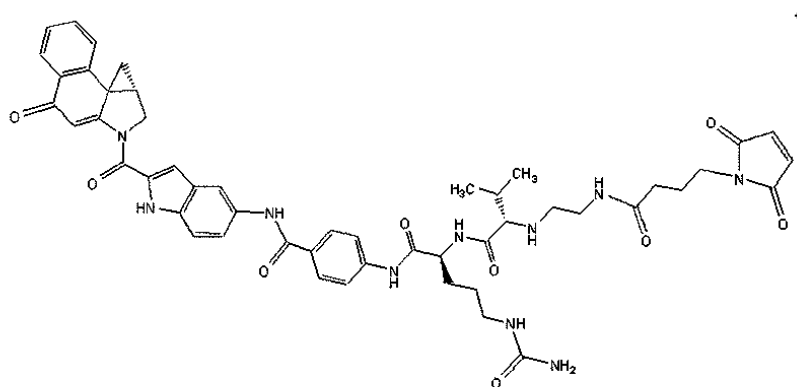
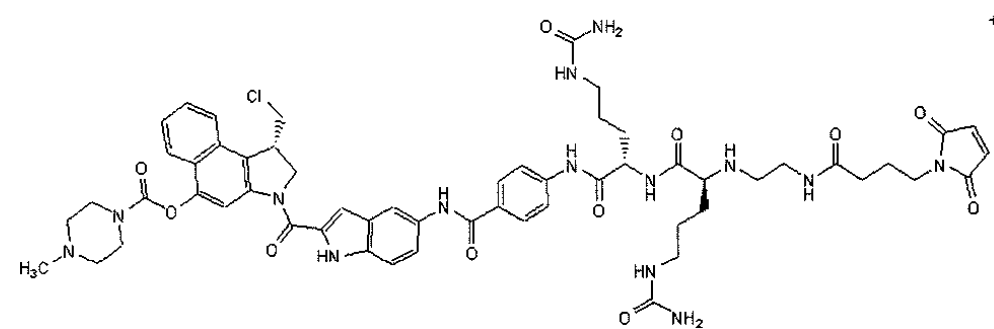
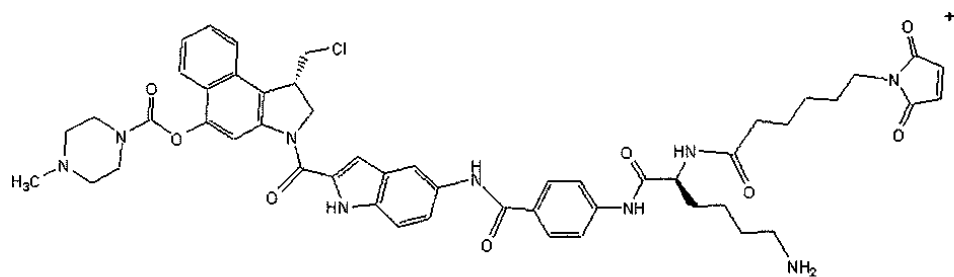


STruc

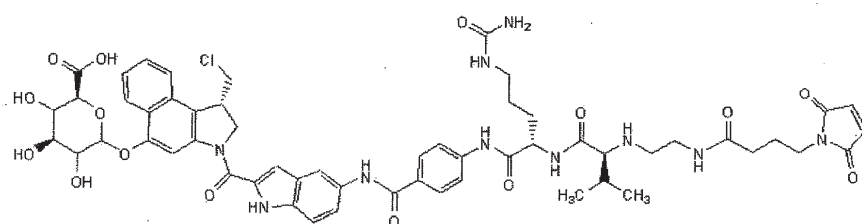


(donde r es un número entero en el intervalo de 0 a 24.

5 También se pueden formar conjugados usando fármacos que tienen las siguientes estructuras:

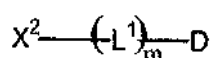


y

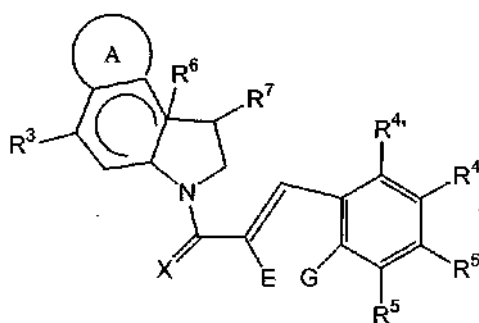


B. Conjugados de enlazador escindible

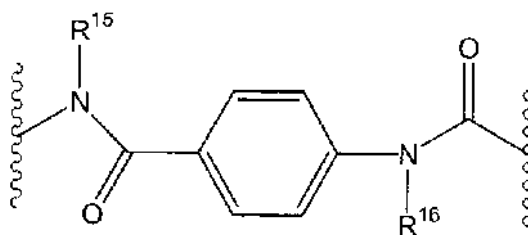
- 5 Un ejemplo de un conjugado adecuado es un compuesto que tiene la siguiente estructura:



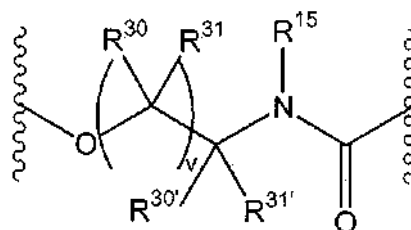
- 10 en la que L^1 es un separador autoinmolable; m es un número entero de 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; X^2 es un sustrato escindible; y D comprende una estructura:



- 15 en la que el sistema del anillo A es un miembro seleccionado entre grupos arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; E y G son elementos seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, un enlace simple, o E y G se unen para formar un sistema de anillo seleccionado entre arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; X es un elemento seleccionado entre O, S y NR^{23} ; R^{23} es un elemento seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, y acilo; R^3 es un elemento seleccionado del grupo que consiste en (=O), SR^{11} , NHR^{11} y OR^{11} , en el que R^{11} es un elemento seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, $C(O)R^{12}R^{13}$, $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $P(O)(OR^{12})_2$, $C(O)CHR^{12}R^{13}$, SR^{12} y $SiR^{12}R^{13}R^{14}$, en la que R^{12} , R^{13} , y R^{14} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido, en la que R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno o de carbono al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; R^6 es un enlace simple que está presente o ausente y, cuando está presente, R^6 y R^7 se unen para formar un anillo de ciclopropilo; y R^7 es CH_2-X^1 o CH_2- unidos en dicho anillo de ciclopropilo con R^6 , en la que X^1 es un grupo saliente, R^4 , R^4 , R^5 y R^5 son elementos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, halógeno, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, o cualquier par adyacente de R^4 , R^4 , R^5 y R^5 , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, se unen para formar un sistema de anillo de cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros, en la que n es un número entero de 1 a 20; R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo no sustituido o sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y peptidilo sustituido o no sustituido, en la que R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema del anillo de heterocicloalquilo que tiene de 4 a 6 miembros, conteniendo opcionalmente dos o más heteroátomos; en la que al menos uno de los elementos R^4 , R^4 , R^5 y R^5 une dicho fármaco a L^1 , si está presente, o a X^2 y se selecciona entre el grupo que consiste en



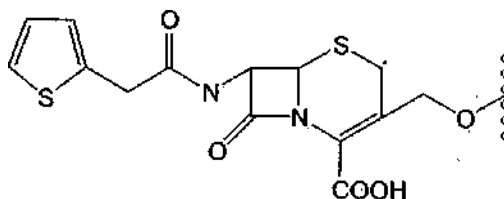
y



- 5 en la que R^{30} , $R^{30'}$, R^{31} , y $R^{31'}$ se seleccionan independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y v es un número entero de 1 a 6.

Los ejemplos de enlazadores escindibles adecuados incluyen β -AlaLeuAlaLeu y

10



Composiciones Farmacéuticas

- 15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición, *por ejemplo*, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una o varias porciones de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Diferentes composiciones puede incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas descritos en el presente documento. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítopos del antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

- 20 Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, junto con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención combinado con al menos otro agente antineoplásico, antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en una terapia de combinación se describen con mayor detalle en el apartado dedicado a los usos de los anticuerpos de la presente invención.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes de retraso de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el principio activo, es decir, anticuerpo, o inmunoconjugado, puede estar revestido con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

- 40 Los compuestos farmacéuticos de la presente invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no transmite ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos monocarboxílicos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y aromáticos sulfónicos y similares. Las sales de

adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

- 5 La composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato de sodio, sulfito sódico, y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetracético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

- 15 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

- 20 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización, más arriba, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol-ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. 25 Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede conseguir mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

- Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

- 35 Las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular en forma de solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible e incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

- 45 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el criodesecado (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

- 55 La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una única forma farmacéutica será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, en un cien por ciento, esta cantidad estará comprendida en un intervalo de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de principio activo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 65 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las

exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma farmacéutica unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias de la presente divulgación está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del principio activo y del efecto terapéutico o profiláctico concreto que se vaya a lograr y (b) de las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho principio activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosis está comprendida de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente, de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o comprendidas en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo conlleva la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para el anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrando el anticuerpo según uno de los siguientes calendarios de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, a continuación cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso, la dosis de cada anticuerpo administrado está comprendida en los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensualmente, cada tres meses, o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, según indiquen las mediciones de los niveles en sangre del anticuerpo al antígeno diana del paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, se puede administrar el anticuerpo como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia variarán dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida más larga, seguido por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se necesita una dosis relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que se reduce el progreso de la enfermedad o esta termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, el paciente puede administrar un régimen profiláctico.

Para su uso en profilaxia y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con una proliferación celular anómala, se prefiere una concentración en circulación del compuesto administrado de aproximadamente 0,001 µM a 20 µM, prefiriéndose de aproximadamente 0,01 µM a 5 µM.

Las dosis de pacientes para la administración oral de los compuestos descritos en el presente documento, están comprendidas de forma típica de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 10.000 mg/día, más normalmente de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 1.000 mg/día, y de forma más preferida, de aproximadamente 50 mg/día a aproximadamente 500 mg/día. Dicho en términos de peso corporal del paciente, las dosificaciones típicas están comprendidas de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 150 mg/kg/día, más normalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/kg/día, y lo más típico, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg/día, por ejemplo 5 mg/kg/día o 3 mg/kg/día.

En al menos algunas realizaciones, las dosis para el paciente que retrasan o inhibir el crecimiento tumoral pueden ser 1 µmol/kg/día o menos. Por ejemplo, las dosis para el paciente pueden ser 0,9, 0,6, 0,5, 0,45, 0,3, 0,2, 0,15, o 0,1 µmol/kg/día o menos (en referencia a los moles del fármaco). Preferentemente, el conjugado de anticuerpo-fármaco retrasa el crecimiento tumoral cuando se administra en la cantidad de dosis diaria durante un periodo de al menos cinco días. En al menos algunas realizaciones, el tumor es un tumor de tipo humano en un ratón SCID. Como ejemplo, el ratón SCID puede ser un CB17. Ratón SCID (disponible de Taconic, Germantown, NY).

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas utilizadas, o del éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración,

la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con el antagonista particular empleado, la edad, sexo, peso, afección, estado de salud general y antecedentes médicos del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las prácticas médicas.

5 Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención da como resultado preferentemente una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos exentos de síntomas, o una prevención de un deterioro o incapacidad debido a la afección por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores CD22⁺, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 %, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema modelo en un animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición se puede medir *in vitro* con ensayos conocidos del técnico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede disminuir el tamaño de un tumor, o bien mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades dependiendo de factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración seleccionada en particular.

La composición de la presente invención se puede administrar mediante una o más vías de administración usando uno o más de varios métodos conocidos en la materia. Como apreciarán lo expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración preferidas para la administración de los anticuerpos de la presente divulgación incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los principios activos se pueden preparar con vehículos que protejan al principio contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los expertos en la técnica conocen de forma general muchos métodos para la preparación de dichas formulación, o bien están patentados. Véanse, *por ejemplo*, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, la composición terapéutica de la presente invención se puede administrar mediante un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos divulgados en las patentes de Estados Unidos con números 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: patente de Estados Unidos n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una tasa controlada; patente de Estados Unidos n.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; patente de Estados Unidos n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamento para suministrar medicamento a una tasa de infusión precisa; patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; patente de Estados Unidos n.º 4.439.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármaco que tiene compartimentos multicámara; y la patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármaco. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHM) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la presente divulgación cruzan la BHM (sí se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva a células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, *por ejemplo*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin.*

Pharmacol. 29:685). Los grupos de direccionamiento ilustrativos incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A del tensioactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos, especialmente los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades y trastornos que implican CD22. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, *por ejemplo, in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar varios trastornos.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "sujeto" incluya animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, *por ejemplo*, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados o modulados por la actividad de CD22. Cuando los anticuerpos para CD22 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la presente invención con CD22, los anticuerpos se pueden usar para detectar específicamente la expresión de CD22 en la superficie de las células y, además, se pueden usar para purificar CD22 mediante purificación por inmovinoafinidad.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos y los inmunoconjugados) de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidos en la técnica y se pueden seleccionar por el experto en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpo.

Como se ha descrito en lo que antecede, los anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 de la presente invención pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos, *por ejemplo*, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede unirse al agente (como inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, *por ejemplo*, una terapia contra el cáncer, *por ejemplo*, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino, bleomicina sulfato, carmustina, clorambucilo, y ciclofosfamida hidroxurea que, por sí solos, son solamente eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos dirigidos contra CD22 humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan mediante diferentes mecanismos que dan como resultado un efecto citotóxico en células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las convertiría en no reactivas con el anticuerpo.

Células efectoras específicas de diana, *por ejemplo*, células efectoras unidas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos) de la presente invención también se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Las células efectoras para direccionamiento de células pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales y otras células que tienen receptores de IgG o IgA. Si se desea, se pueden obtener células efectoras del sujeto que se va a tratar. Las células efectoras específicas de diana se pueden administrar en forma de una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser de aproximadamente 10^8 - 10^9 pero variará dependiendo del objetivo terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, *por ejemplo*, un tumor que expresa CD22, y para efectuar la destrucción celular mediante, *por ejemplo*, fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de diana se puede llevar a cabo junto con otras técnicas para la eliminación de las células diana. Por ejemplo, la terapia antitumoral que utiliza las composiciones de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos) de la presente invención y/o células efectoras armadas con dichas composiciones se pueden usar junto con quimioterapia. Adicionalmente, se puede utilizar inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones de células efectoras citotóxicas diferentes hacia el rechazo de una célula

tumoral. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos dirigidos contra CD22 unidos a un RI contra FC o un anticuerpo dirigido contra CD3 junto con agentes de unión específicos del receptor IgG o IgA.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas descritas en este documento también se pueden utilizar para modular niveles de FcγR o FcγR en células efectoras, tal como mediante la protección y eliminación de los receptores sobre la superficie celular. Las mezclas de receptores contra Fc también se pueden utilizar con este fin.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, e inmunoconjugados) de la presente invención que tienen sitios de unión al complemento, tales como porciones de IgG1, IgG-2, o IgG-3 o IgM que se unen al complemento, también pueden utilizarse en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células diana con un agente de unión de la presente divulgación y las células efectoras adecuadas se puede suplementar mediante la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de las células diana revestidas con un agente de unión de la presente divulgación se puede mejorar con la unión de las proteínas del complemento. En otra realización, las células diana revestidas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos) de la presente invención, también se pueden lisar mediante el complemento. En otra realización más, las composiciones de la presente invención no activan el complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, e inmunoconjugados) de la presente invención también se pueden administrarse junto con el complemento. Por consiguiente, las composiciones pueden comprender los anticuerpos humanos y suero o complemento. Dichas composiciones son ventajosas porque el complemento se encuentra muy cerca de los anticuerpos humanos. Como alternativa, los anticuerpos humanos y el complemento o el suero se pueden administrar por separado.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar junto con uno o más agentes terapéuticos u otros agentes de unión, tales como proteínas de fusión con Ig. Los ejemplos no limitantes de otros anticuerpos o agentes de unión con los que se pueden administrar el anticuerpo dirigido contra CD22 incluyen anticuerpos o agentes de unión a CTLA-4, PSMA, CD30, IP-10, IFN-γ, CD70, PD-1, PD-L1, TNF, TNF-R, VEGF, VEGF-R, CCR5, IL-1, IL-18, IL-18R, CD19, Campat-1, EGFR, CD33, CD20, Her-2, CD25, gp11b/IIIa, IgE, CD11a, α4 integrina.

Se describen kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la presente invención (por ejemplo, anticuerpos humanos, o inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tal como un reactivo inmunosupresor* un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno de CD22 diferente del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, los pacientes tratados con dichas composiciones de anticuerpos pueden recibir adicionalmente (antes de, simultáneamente con, o después de la administración de un anticuerpo humano de la presente divulgación) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencie o aumente el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otras realizaciones, el sujeto se puede tratar adicionalmente con un agente que modula, *por ejemplo*, potencia o inhibe, la expresión o la actividad de receptores de Fcγ o Fcγ, por ejemplo, por tratamiento del sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas para su administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluye el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos) de la presente invención también se pueden usar para dirigirse a células diana que expresan CD22, por ejemplo, para marcar dichas células. Para dicho uso, el agente de unión se puede unir a una molécula que se puede detectar. Por lo tanto, se describen métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CD22. La marca detectable puede ser, *por ejemplo*, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de una enzima.

En una realización particular, se describen métodos para detectar la presencia del antígeno CD22 en una muestra, o para medir la cantidad del antígeno CD22, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CD22, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y CD22 humana. A continuación se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia en la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra del control es indicativa de la presencia de antígeno CD22 humano en la muestra.

En otra realización más, los inmunoconjugados de la invención se pueden usar para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, etiquetas, citotoxinas, radiotoxinas inmunosupresoras, etc.) a células que expresan CD22 mediante la unión de dichos compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD22 se puede conjugar con cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las patentes de Estados Unidos con números 6.281.354 y 6.548.530, las publicaciones de patente de Estados Unidos con números 20030050331, 20030064984,

20030073852, y 20040087497, o publicadas en los documentos WO 03/022806. Por lo tanto, la invención también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan CD22 (por ejemplo, con una marca detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de una enzima). Como alternativa, los inmunoconjugados se pueden utilizar para destruir células que tienen receptores de la superficie celular para CD22 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas a CD22.

Se sabe que CD22 se expresa en una gran porcentaje de linfomas de linfocitos B y también se sabe que está implicada en la regulación de la actividad de los linfocitos B de tal forma que los trastornos autoinmunitarios se pueden tratar mediante direccionamiento de CD22. Por consiguiente, los anticuerpos dirigidos contra CD22 (e inmunoconjugados) de la presente invención se pueden utilizar para modular la actividad de CD22 en cada una de estas situaciones clínicas.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD22. El método comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa CD22 con el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, de tal forma que el crecimiento de la célula tumoral que expresa CD22 queda inhibido. Preferentemente, la célula tumoral que expresa CD22 es un linfoma de células B, tal como un linfoma no de Hodgkin. Otros tipos de células tumorales que expresan CD22 incluyen linfoma de Burkitt y leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B.

En una realización del método de inhibir el crecimiento de las células tumorales, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, está conjugado a una molécula ligando, tal como un agente terapéutico, tal como citotoxina, radioisótopo o agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se administra junto con uno o más agentes antitumorales adicionales. El anticuerpo se puede usar junto con otros tratamientos contra el cáncer, tales como la cirugía y/o la radiación, y/o con otros agentes antineoplásicos, tales como los agentes antineoplásicos analizados y definidos anteriormente, incluidos fármacos quimioterapéuticos y otros anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un anticuerpo dirigido contra CD20 (por ejemplo, Rituxan®).

En otro aspecto, la invención proporciona el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, de tal forma que el trastorno inflamatorio o autoinmunitario del sujeto se trate. Los ejemplos no limitativos de trastornos autoinmunitarios preferidos incluyen lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. Otros ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino (incluidas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn), diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis autoinmunitaria (incluidas la enfermedad de Grave y la tiroiditis de Hashimoto), psoriasis y glomerulonefritis. El anticuerpo se puede usar solo o junto con otros agentes antiinflamatorios o inmunosupresores, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticoesteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), metotrexato, inhibidores de COX-2, antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept, infliximab, adalimumab) e inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, azatioprina y ciclosporina A).

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como una limitación adicional.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra CD22

Los anticuerpos monoclonales humanos contra CD22 se generaron usando ratones transgénicos que expresan genes de anticuerpos humanos, del siguiente modo.

Antígeno

Los antígenos utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra CD22 fueron el dominio extracelular de la CD22 humana y la proteína CD22 de longitud completa expresada en células CHO. Para obtener el dominio extracelular, se usó un ADNc que codifica la CD22 humana (comercialmente disponible de Open Biosystems, Inc.) para construir un vector de expresión que codifica el dominio extracelular completo de CD22β (ECD CD22) fusionado a una etiqueta de hexahistidina en el extremo C. Después de la transfección de células CHO y la selección de transfectantes estables mediante técnicas convencionales, ECD CD22 se purificó del medio de cultivo celular usando cromatografía con quelato de metales. Además, se crearon células CHO recombinantes que expresaban la CD22 de longitud completa sobre la superficie celular mediante la transfección de las células con un vector de expresión que contenía el ADNc de CD22 de longitud completa. Después de la selección de las células transfectadas, las células que expresan elevados niveles de CD22 sobre la superficie celular se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia, basándose en su reactividad con un anticuerpo dirigido contra CD22 marcado con fluoresceína (comercialmente disponible de Becton-Dickinson-Pharmingen).

Cepas de ratón

Se prepararon anticuerpos monoclonales completos contra CD22 usando cepas HCo7/Hco12 y Hco12/Balbc del HuMAb transgénico Mouse®, y las cepas KM y KM-λHAC de ratones transgénicos, que expresan todos ellos genes de anticuerpos humanos.

En cada una de estas cepas de ratón, el gen de la cadena ligera kappa endógeno de ratón se perturbó homocigóticamente como se describe en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 811-820 y el gen de la cadena pesada endógeno de ratón se perturbó homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187, Cada una de estas cepas lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851) y también contiene el transgenoma SC20, que contiene el locus de la cadena pesada de la Ig humana, tal como se describe en la publicación PCT WO 02/43478.

La cepa HCo7 contiene el transgén HCo7 de la cadena pesada humana como se describe en las patentes de Estados Unidos con números 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa HCo12 contiene el transgén HCo12 de la cadena pesada humana que se describe en el Ejemplo 2 de la publicación PCT WO 01/09187.

La cepa KM Mouse® se detalladamente en la solicitud estadounidense n.º 20020199213.

La cepa KM-λHAC es muy similar a la cepa KM en que los loci endógenos de la cadena pesada y la cadena ligera kappa de ratón se han perturbado, y en que se han introducido el transgenoma SC20 y el transgén KCo5, pero la cepa KM-λHAC también incluye un cromosoma artificial humano derivado del cromosoma 22 humano que contiene el locus de la cadena ligera lambda humana. Por lo tanto, la cepa KM-λHAC puede expresar anticuerpos humanos que utilizan una cadena ligera tanto lambda como kappa. Los ratones KM-λHAC también se describen detalladamente en la solicitud estadounidense n.º 20060015958.

Inmunización

Para sensibilizar anticuerpo monoclonales completamente humanos contra CD22, los animales de las cepas anteriormente descritas se inmunizaron con ECD CD22 recombinante humana y células CHO que expresan CD22 (preparadas como se ha descrito anteriormente para el antígeno). Los esquemas de inmunización general para la sensibilización de los anticuerpos humanos en cepas de ratón que contienen genes de anticuerpos humanos se describen en, por ejemplo, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y en la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 10-12 semanas de edad cuando se iniciaron las inmunizaciones. Los ratones se inmunizaron semanalmente por vía intraperitoneal y subcutánea con 20 µg de ECD CD22 o 10⁷ células CHO transfectadas con RIBI como adyuvante. Las dos primeras inmunizaciones se realizaron con ECD CD22 en adyuvante RIBI seguido por seis inmunizaciones semanales adicionales usando de forma alternada ECD CD22 o células transfectadas (hasta un total de 8 inmunizaciones). La respuesta inmunitaria se controló en sangre recogida mediante extracción de sangre retroorbital. El suero se cribó mediante ELISA y FACS. Los ratones con títulos adecuados de inmunoglobulina IgG dirigida contra CD22 humana se usaron para las fusiones. Los ratones recibieron un refuerzo una vez con ECD CD22 y una vez con células CHO que expresan CD22 tanto por vía intravenosa como por vía intraperitoneal los días -4 y -3, respectivamente, antes del sacrificio y extracción el bazo.

Selección de anticuerpos

Para identificar ratones que producen anticuerpos que se unen a CD22, el suero procedente de ratones inmunizados se cribó mediante citometría de flujo para determinar su unión a células CHO que expresan CD22 humana, así como a células CHO precursoras. El suero también se cribó mediante citometría de flujo (FACS) en células Daudi B humanas, que expresan CD22. El suero de todos los ratones inmunizados se analizó a una dilución de 1:50 en el experimento FACS. Tras la adición de suero diluido a las células e incubación durante 30 minutos a 37 °C, las células se lavaron y la unión se detectó con un Ab dirigido contra IgG humana marcado con PE. Los análisis de citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Un anticuerpo monoclonal de murino dirigido contra CD22 (M anti-CD22) se usó como control positivo en el experimento. Los tres ratones estudiados mostraron títulos contra células CHO-CD22 y CHO precursoras (CHO-S). La unión a células CHO-S refleja la presencia de anticuerpos que se unen a moléculas diferentes a CD22 sobre la superficie de células CHO. Este resultado era esperado porque los ratones se inmunizaron con células CHO transfectadas. También se detectaron títulos contra células Daudi humanas en los tres ratones, lo que indica la posible presencia de anticuerpos específicos de CD22 que podrían unir CD22 desde una fuente no recombinante.

Los sueros se analizaron adicionalmente para determinar la unión ECD CD22 mediante ELISA. Brevemente, las placas de microtitulación se revistieron con proteína de ECD CD22 purificada producida en células CHO a 1-2,5 µg /ml en PBS (50 µl/pocillo) durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, la placa se bloqueó con 300 µl/pocillo de BSA al 1 % en PBS. Las diluciones de los sueros (de 100 a 20000) procedentes de los ratones inmunizados con CD22 se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con

peroxidasa de rábano picante (HRP) a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras el lavado, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, n.º A9941) en tampón fosfato-citrato con perborato (Sigma n.º P4922) o Moss ABTS-1000 y se analizó mediante espectrofotometría a una DO 415-495 nm. Los tres ratones analizados mostraron buen título de anticuerpos dirigidos contra CD22 y, por tanto, se usaron para las fusiones.

Fusiones de esplenocitos

Los esplenocitos de ratón se fusionaron con una línea de célula de mieloma de ratón usando electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión celular CytoPulse de cámara grande (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Las suspensiones monocelulares de esplenocitos procedentes de ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma de ratón Ag8.653 (ATCC, CRL 1581) en una relación 1:1. Las células se sembraron en placas a aproximadamente 2×10^4 pocillo en placas de microtitulación de fondo plano. Las placas se incubaron durante una semana en medio DMEM con alto contenido de glucosa con L-glutamina, piruvato de sodio (Mediatech, Inc., Herndon, VA), suero de feto bovino al 10 % (Hyclone, Logan, UT), medio condicionado P388DI al 18 %, factor de clonación Origen Hybridoma al 5 % (BioVeris, Gaithersburg, VA), L-glutamina 4 mM, HEPES 5 mM, β -mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina y IX Hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). Después de una semana (día 7), el medio de crecimiento se sustituyó con medio que contenía HT. Cuando se produjeron grandes cantidades de hibridoma (día 10-11), los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos contra IgG humana en un ensayo homogéneo HTRF. Las fusiones procedentes de ratones KM- λ HAC se cribaron para determinar la presencia de IgG humana que contenía una cadena ligera kappa humana o lambda humana. A continuación, los hibridomas positivos se cribaron mediante FACS en células Daudi y mediante ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgG humanos específicos de CD22. Los experimentos ELISA y FACS se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente salvo que los sobrenadantes del hibridoma (50-100 μ l/pocillo) se usaron en lugar de las diluciones séricas. Las líneas de hibridoma precursor específicos del antígeno se transfirieron a placas de 24 pocillos, se volvieron a cribar y, si seguían siendo positivos para la IgG humana, se subclonaron una vez mediante dilución limitante. Los subclones estables se escalaron después *in vitro* y los anticuerpos se purificaron para su caracterización adicional.

Se seleccionaron dieciocho subclones para su expansión para la purificación de anticuerpos. Los isotipos de los subclones expandidos incluyeron los siguientes isotipos: IgG1; IgG4; IgG4/IgM; IgG1/IgM; IgG1/IgG2 λ ; e IgG4 λ . Treinta de los anticuerpos purificados se titularon mediante ELISA y FACS y cada uno mostró unión específica a CD22 humana en ambos ensayos. Cuatro subclones, 12C5, 19A3, 16F7, 23C6, se seleccionaron para análisis estructural y secuenciación adicional.

Producción de anticuerpos recombinantes CD22.1 y CD22.2

El anticuerpo dirigido contra CD22, 19A3, se expresó en células CHO como una IgG1 humana (alotipo f) y el anticuerpo recombinante se designó como CD22.1. Además, se preparó una variante de 19A3 designada como CD22.2 en la que la mutación N57Q se realizó para eliminar el sitio de N-glicosilación en la región CDR2 de la cadena V_H.

Las regiones V_K y V_H de 19A3 se amplificaron por PCR a partir de clones de ADNc y se clonaron en pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) para producir sitios de restricción para clonación. A continuación, se llevó a cabo mutagénesis dirigida al emplazamiento para introducir una mutación N57Q en la secuencia de la cadena pesada para eliminar el sitio de N-glicosilación en CDR2. La región V_K de 19A3 se subclonó en el vector pICOFsNeoK2.hCMV2.1kb para producir el vector pICOFsNeoK2.hCMV2.1kb(CD22.19A3), y la región V_H (tanto natural como la mutación N57Q) se subclonaron en el vector pICOFsSpurG para producir vectores pICOFsSpurG(CD22.19A3) y pICOFsSpurG(CD22.19A3.VH.N57Q). Estas construcciones para la expresión de las cadenas ligera y pesada se linealizaron y se contranfectaron en células CHO-S usando DMRIE-C (Invitrogen) y los clones estables se seleccionaron usando técnicas convencionales.

El clon 8G9 de CHO-S se seleccionó para la expresión de CD22.1. Un sobrecrecimiento del cultivo de este clon produjo aproximadamente 75 mg/litro del anticuerpo. El clon 17E11 de CHO-S se seleccionó para la expresión de CD22.2 y produjo aproximadamente 413 mg/litro en un cultivo de sobrecrecimiento. La estructura y la función de los anticuerpos recombinantes CD22.1 y CD22.2 se determinó a continuación (véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 10, más adelante).

Ejemplo 2: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD22

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los mAb expresados por los clones 12C5, 19A3, 16F7, 23C6, CD22.1, CD22.2, 4G6 y 21F6 descritos en el Ejemplo 1 se secuenciaron usando técnicas convencionales de secuenciación de ADN y las proteínas expresadas se caracterizaron mediante análisis convencional de química de proteínas.

Caracterización de 12C5, 19A3, CD22.1, CD22.2, 16F7 y 23C6

Se descubrió que el clon 12C5 expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera lambda de IgG1. Se descubrió que el clon 19A3 expresaba un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG1. Las cadenas pesada y ligera de los mAb recombinantes expresadas por el clon 8G9 fueron idénticas a las expresadas por el clon 19A3. La cadena pesada del mAb recombinante expresado por el 17E11 fue idéntica a la del 19A3 con la excepción de la mutación N57Q. La cadena ligera del mAb recombinante expresado por el clon 17E11 fue idéntica a la expresada por el clon 19A3. Se descubrió que el clon 16F7 expresaba anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una de dos cadenas ligeras kappa diferentes de IgG1 (denominadas en el presente documento como V_K.1 y V_K.2, en el que el 43 % de la proteína del anticuerpo comprende V_K.1 y el 57 % de la proteína del anticuerpo comprende V_K.2). También se descubrió que el clon 23C6 expresa anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una de dos cadenas ligeras kappa diferentes de IgG1 (V_K.1 y V_K.2, en el que el 40 % de la proteína del anticuerpo comprende V_K.1 y el 60 % de la proteína del anticuerpo comprende V_K.2). Se descubrió que el clon 4G6 expresaba anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una de dos cadenas ligeras kappa diferentes de IgG1 (denominadas en el presente documento como V_K.1 y V_K.2). Se descubrió que el clon 21F6 expresaba anticuerpos que comprenden una de dos cadenas pesadas diferentes (denominadas en el presente documento como V_H.1 y V_H.2) y una cadena ligera kappa de IgG1.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 12C5 se muestran en la Figura 1A y en la SEQ ID NO:41 y 31, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera lambda de 12C5 se muestran en la Figura 1B y en la SEQ ID NO:45 y 35, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 12C5 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 12C5 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 7-4.1 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-3 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 6B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 12C5 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 1A y en las SEQ ID NO: 1, 5 y 9, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 12C5 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera lambda de 12C5 utiliza un segmento V_L 2b2 procedente de la línea germinal humana y un segmento J_L procedente de la línea germinal humana 2 de J_L. El análisis adicional de la secuencia de V_L de 12C5 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 1B y en las SEQ ID NOS: 13, 19 y 25, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 19A3 se muestran en la Figura 2A y en las SEQ ID NOS:42 y 32, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de CD22.1 son idénticas a las de 19A3, y se corresponden con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos mostradas en la Figura 2A y las SEQ ID NOS:42 y 32, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de CD22.2 se muestran en la Figura 2C y en las SEQ ID NO:61 y 60, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 19A3 se muestran en la Figura 2B y en la SEQ ID NO:46 y 36, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligeras de CD22.1 y CD22.2 son idénticas a las de 19A3, y se corresponden con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos mostradas en la Figura 2A y las SEQ ID NOS:46 y 36, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 19A3/CD22.1 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 19A3 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 4-34 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-9 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 19A3/CD22.1 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 2A y en las SEQ ID NOS: 2, 6 y 10, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de CD22.2 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de CD22.2 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 4-34 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-9 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de CD22.2 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 2C y en las

SEQ ID NOs: 2, 60 y 10, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 19A3/CD22.1/CD22.2 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera kappa de 19A3/CD22.1/CD22.2 utiliza un segmento V_K L6 procedente de la línea germinal humana y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 1 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_K de 19A3/CD22.1/CD22.2 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 2B y en las SEQ ID NOs: 14, 20 y 26, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 16F7 se muestran en la Figura 3A y en la SEQ ID NO:43 y 33, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa V_K.1 de 16F7 se muestran en la Figura 3B y en la SEQ ID NO:47 y 37, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa V_K.2 de 16F7 se muestran en la Figura 3C y en la SEQ ID NO:48 y 38, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 16F7 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 16F7 utiliza un segmento V_H procedente de 5-51 de V_H de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-10 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 3B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 16F7 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 3A y en las SEQ ID NO: 3, 7 y 11, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera V_K.1 kappa de inmunoglobulina de 16F7 KB y las secuencias de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera V_K.1 kappa de 16F7 utiliza un segmento V_K procedente de la línea germinal humana A27 de V_K y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 1 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_K de 16F7 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 3B y en las SEQ ID NOs: 15, 21 y 27, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera V_K.2 kappa de inmunoglobulina de 16F7 KB y las secuencias de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera V_K.2 kappa de 16F7 utiliza un segmento V_K procedente de la línea germinal humana A10 de V_K y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 2 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_K de 16F7 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 3C y en las SEQ ID NOs: 16, 22 y 28, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 23C6 se muestran en la Figura 4A y en la SEQ ID NO:44 y 34, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa V_K.1 de 23C6 se muestran en la Figura 4B y en la SEQ ID NO:49 y 39, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa V_K.2 de 23C6 se muestran en la Figura 4C y en la SEQ ID NO:50 y 40, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 23C6 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 23C6 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 1-69 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 2-15 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 6B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 23C6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 4A y en las SEQ ID NO:4, 8 y 12, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera V_K.1 kappa de inmunoglobulina de 23C6 KB y las secuencias de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera V_K.1 kappa utiliza un segmento V_K procedente de la línea germinal humana L6 de V_K y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 1 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_K.1 de 23C6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 4B y en las SEQ ID NO:17, 23 y 29, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera V_K.2 kappa de inmunoglobulina de 23C6 KB y las secuencias

de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera $V_{\kappa}2$ kappa utiliza un segmento V_{κ} procedente de la línea germinal humana L6 de V_{κ} y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 1 de JK. El análisis adicional de la secuencia de $V_{\kappa}2$ de 23C6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 4B y en las SEQ ID NO:18, 24 y 30, respectivamente.

La Figura 5A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 12C5 (SEQ ID NO:31) con la secuencia de aminoácidos de V_H 7-4.1 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:51). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 5B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera lambda de 12C5 (SEQ ID NO:35) con la secuencia de aminoácidos de V_{λ} 2b2 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:55). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 6A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 19A3 y la secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de CD22.1 (SEQ ID NO:32) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:52). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 6B muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera kappa de 19A3, CD22.1 CD22.2 (todas ellas idénticas a la SEQ ID NO:36) con la secuencia de aminoácidos de L6 de V_{κ} de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:56). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 6C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de CD22.2 (SEQ ID NO:32) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:52). Las mutaciones en las regiones CDR1 y CDR2 están delineadas.

La Figura 7A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 16F7 (SEQ ID NO:33) con la secuencia de aminoácidos de V_H 5-51 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:53). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 7B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera $V_{\kappa}1$ kappa de 16F7 (SEQ ID NO:37) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} A27 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:57). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 7C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera $V_{\kappa}2$ kappa de 16F7 (SEQ ID NO:38) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} A10 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:58). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 8A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 23C6 (SEQ ID NO:34) con la secuencia de aminoácidos de V_H 1-69 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:54). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 8B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera $V_{\kappa}1$ kappa de 23C6 (SEQ ID NO:39) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera $V_{\kappa}2$ kappa (SEQ ID NO:40) con la secuencia de aminoácidos de L6 de V_{κ} codificada (SEQ ID NO:56). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

Caracterización de 4G6 y 21F6

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4G6 se muestran en la Figura 17A y en la SEQ ID NO:87 y 81, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa $V_{\kappa}1$ de 4G6 se muestran en la Figura 17B y en la SEQ ID NO:90 y 84, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa $V_{\kappa}2$ de 4G6 se muestran en la Figura 17C y en la SEQ ID NO:91 y 85, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 4G6 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 4G6 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 1-69 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 7-27 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 4G6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 17A y en las SEQ ID NO: 63, 66 y 69, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera V_{κ} .1 kappa de inmunoglobulina de 4G6 y las secuencias de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera V_{κ} .1 kappa de 16F7 utiliza un segmento V_{κ} procedente de la línea germinal humana L18 de V_{κ} y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 2 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_{κ} de 4G6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 3B y en las SEQ ID NOS: 72, 75 y 78, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera V_{κ} .2 kappa de inmunoglobulina de 4G6 KB y las secuencias de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera V_{κ} .2 kappa de 4G5 utiliza un segmento V_{κ} procedente de la línea germinal humana A27 de V_{κ} y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 4 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_{κ} de 4G6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 17C y en las SEQ ID NOS: 73, 76 y 79, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada V_H .1 de 21F6 se muestran en la Figura 18A y en la SEQ ID NO:88 y 82, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada V_H .2 de 21F6 se muestran en la Figura 18B y en la SEQ ID NO:89 y 83, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa de 21F6 se muestran en la Figura 18C y en la SEQ ID NO:92 y 86, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada V_H .1 de inmunoglobulina de 21F6 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 21F6 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 4-34 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-9 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 21F6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestran en la Figura 3A y en las SEQ ID NO: 64, 67 y 70, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera kappa V_H .2 de la inmunoglobulina de 21F6 y las secuencias de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada V_H .2 de 21F6 utiliza un segmento V_H procedente de V_H 4-34 de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-9 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4B de JH de la línea germinal humana. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 21F6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 18B y en las SEQ ID NOS: 65, 68 y 71, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina de 21F6 y las secuencias de la cadena kappa ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera kappa de 21F6 utiliza un segmento V_{κ} procedente de la línea germinal humana L6 de V_{κ} y un segmento JK procedente de la línea germinal humana 4 de JK. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 21F6 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delinación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestran en la Figura 18C y en las SEQ ID NOS: 74, 77 y 80, respectivamente.

La Figura 19A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 4G6 (SEQ ID NO:81) con la secuencia de aminoácidos de V_H 1-69 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:54). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 19B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera V_{κ} .1 kappa de 4G6 (SEQ ID NO:84) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} .1 de L18 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:93). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 18C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera V_{κ} .2 kappa de 4G6 (SEQ ID NO:85) con la secuencia de aminoácidos de V_{κ} A27 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:57). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 20A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada V_H .1 de 21F6 (SEQ ID NO:82) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:52). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 20B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa V_H .2 de 21F6 (SEQ ID NO:83) con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-34 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:52). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 20C muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de 21F6 (SEQ ID NO:86) con la secuencia de aminoácidos de V_K L6 de la línea germinal codificada (SEQ ID NO:56). Las mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

5 Conversión de isotipo recombinante

Las regiones variables de 12C5, 19A3, 16F7, 23C6, CD22.1, CD22.2, 4G6 y 21F6 se pueden convertir en anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo deseado usando técnicas convencionales de ADN recombinante. Por ejemplo, el ADN que codifica las regiones V_H y V_L se puede clonar en un vector de expresión que contiene las regiones constantes de la cadena y pesada e forma que las regiones variables están operativamente unidas a las regiones constantes. Como alternativa, se pueden utilizar vectores independientes para la expresión de la cadena pesada de longitud completa y de la cadena ligera de longitud completa. Los ejemplos no limitantes de los vectores de expresión adecuados para su uso en la creación de los anticuerpos de longitud completa incluyen los vectores pIE descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20050153394 de Black.

15 **Ejemplo 3: Características de unión de los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD22**

En este ejemplo, las afinidades de unión de los anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7, 23C6 y 4G6 dirigidos contra CD22 se examinaron mediante análisis BIAcore. La retención de la afinidad de unión a CD22 de los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 derivados recombinantes de 19A32 se confirmó mediante análisis ELISA y citometría de flujo FACS.

Se llevó a cabo el agrupamiento de epítopos de los anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7, y 23C6 mediante el análisis BIAcore.

Finalmente, los dominios de CD22 a los cuales se unen específicamente los anticuerpos dirigidos contra CD22 de la presente invención se cartografiaron utilizando células CHO que expresaban una proteína de fusión que contenía solo los dominios 1 y 2 del extremo amino de CD22.

30 Afinidad y cinética de unión

Para la determinación de la afinidad del anticuerpo (K_D), se llevaron a cabo experimentos en los cuales se capturó el antígeno de CD22 en un chip BIAcore utilizando un anticuerpo contra la etiqueta His presente en el antígeno. El anticuerpo monoclonal ab15149 dirigido contra His (Abeam, Stock cone, 0,5 mg/ml) se revistió sobre un chip CM5 a alta densidad (3500RU), como recomendó el fabricante. Se capturó CD22 ECD (6,6 µg/ml) sobre esta superficie durante 60 s a un caudal de 6 µl/min. Se inyectó una única concentración (20 µg/ml) de mAb dirigidos contra CD22 purificados sobre el antígeno capturado con un tiempo de asociación de 5 minutos y un tiempo de disociación de 8 minutos, a un caudal de 25 µg/ml. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo con 10 µl de NaOH 25 mM. Se analizaron los controles del isotipo sobre el chip y se utilizaron los datos para sustraer la unión no específica. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un instrumento de resonancia de plasmón superficial BIAcore 3000, utilizando un software de control BIAcore v 3.2. Se llevó a cabo el análisis de los datos usando el software BiaEvaluation v. 3.2.

Se probaron catorce de los anticuerpos dirigidos contra CD22 seleccionados en el experimento de afinidad. El intervalo de los valores de afinidad obtenidos para los doce anticuerpos fue $0,07$ - $9,95 \times 10^{-9}$ M. Los resultados para los cuatro anticuerpos estructuralmente caracterizados en el Ejemplo 2 se resumen a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Datos de unión de BIAcore para los HuMAb dirigidos contra CD22.

Anticuerpo dirigido contra CD22	Afinidad según BIAcore (K_D) 10^{-9} M
Control positivo	1,48
12C5	0,23
19A3	0,15
16F7	1,03
23C6	0,87
4G6	0,07

50 Retención de la afinidad de unión a CD22 de los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 derivados recombinantes

Para determinar si CD22.1 y CD22.2 retuvieron la afinidad de unión a CD22, se llevó a cabo el análisis ELISA en el que se compararon la unión a CD22 ECD por CD22.1 y CD22.2 con la unión por el anticuerpo 19A3 precursor derivado de hibridoma.

El dominio extracelular de CD22 recombinante (CD22 ECD) se revistió sobre placas ELISA de 96 pocillos a 2 µg/ml, y tras lavado, bloqueo con albúmina de suero de bovino al 5 % y lavado de nuevo, los anticuerpos de ensayo se titularon a partir de 10 µg/ml en diluciones 1:3. Tras incubar durante una hora, se lavaron las placas y se añadió

anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con HRP a cada pocillo. Tras una hora más de incubación, se lavaron las placas de nuevo y se unieron al conjugado de HRP detectado mediante la adición de sustrato TMB, incubando hasta que se reveló el color y deteniendo con ácido clorhídrico 1 M. A continuación se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450 nm. Los resultados (Figura 12) mostraron claramente que la capacidad de CD22.1 y CD22.2 de unirse a ECD de CD22 era equivalente al anticuerpo 19A3 precursor. Esto desveló que la expresión del anticuerpo en las células CHO era satisfactoria, y que la mutación para eliminar el sitio de N-glicosilación no afecta la unión al antígeno.

Se investigó también la capacidad de los anticuerpos monoclonales 4G6 y 21F6 dirigidos contra CD22 para unirse a ECD de CD22 y se descubrió que se unían específicamente a ECD de CD22.

Análisis FACS de CD22 expresada sobre superficies celulares

Se confirmó también la capacidad de CD22.1 y CD22.2 para unirse a CD22 mediante citometría de flujo. Células CHO transfectadas con CD22 de longitud completa (CHO-CD22) o células Raji se volvieron a suspender en tampón FACS a 2×10^5 células/pocillo, y después aglomerar las células, se tituló el anticuerpo en los pocillos comenzando a 10 µg/ml y diluyendo en serie 1:3. Tras mezclar e incubar en hielo durante 45 minutos, se añadió el tampón FACS y se lavaron las células 4 veces. Tras el lavado, se añadió anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con PE, y tras una incubación adicional de 30 minutos en hielo, se lavaron las células de nuevo 4 veces antes de volverse a suspender en tampón FACS, leyendo la fluorescencia PE en una máquina de matriz FACS. Los resultados (Figuras 13 y 14) mostraron que CD22.1 y CD22.2 se unían fuertemente y de forma equivalente a los transfectantes CHO-CD22 y a las células Raji.

La unión de 4G6 y 21F6 a CD22 expresada sobre las superficies de las células Raji y células CHO transformadas con CD22 se analizó también mediante análisis FACS. Los resultados demostraron que se obtuvo un alto nivel de unión celular. Véanse las Figuras 21, 22A y 22B. Ningún anticuerpo fue capaz de unirse a células CHO sin la transfección con CD22.

Agrupamiento de epítomos

El agrupamiento de epítomos se llevó a cabo inmovilizando los anticuerpos sobre el chip CM5, según en protocolos de inmovilización normalizados y haciendo fluir los complejos antígeno-anticuerpo sobre la superficie. Los anticuerpos que tenían epítomos solapantes se eliminaron por competición mientras que aquellos que no tenían epítomos solapantes dieron lugar a la unión simultánea al antígeno. Una señal creciente denota un epítomo diferente del anticuerpo revestido sobre el chip, y lo contrario es verdadero si la señal disminuye. Los anticuerpos que presentaron constantes de disociación más rápidas se seleccionaron para revestirse sobre el chip CM5 de Biacore ya que facilitarían una regeneración más fácil para el uso repetido del chip. Los anticuerpos dirigidos contra CD22 purificados se revistieron a altas densidades sobre diferentes superficies de diferentes chips CM5. Se llevaron a cabo varios ciclos de unión iterativos hasta que se identificaron distintos grupos de epítomos. Las concentraciones de los anticuerpos variaron entre 50-200 µg/ml, que se incubaron con ECD de CD22 4 nM-50 nM durante 2 h a TA. Los complejos incubados se pasaron sobre las superficies revestidas de anticuerpo en cada chip durante 2-6 min a 5-10 µl/min. Cada ciclo se regeneró mediante NaOH 15-30 mM. La señal obtenida después de 2-5 minutos de inyección se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpo para determinar los grupos de epítomos. Los anticuerpos se agruparon en varios epítomos basándose en la interpretación anterior de la observación experimental.

Los resultados del experimento de agrupación de epítomos fueron que se podían identificar cuatro grupos de epítomos distintos. De los catorce anticuerpos dirigidos contra CD22 examinados, se encontró que cinco eran del Grupo de epítomos 1, se encontró que tres eran del Grupo de epítomos 2, se encontró que cuatro eran del Grupo de epítomos 3, se encontró uno que era del Grupo de epítomos 4 y se encontró uno que era de los Grupos de epítomos 3 y 4, lo que indica que existe algún solapamiento entre los grupos de epítomos 3 y 4. Los resultados de los cuatro anticuerpos estructuralmente caracterizados en el Ejemplo 2 se resumen a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2. Grupos de epítomos de CD22 cartografiados mediante BiAcCore

Anticuerpo dirigido contra CD22	Grupo de epítomos
Control positivo	1
12C5	4
19A3	1
16F7	3
23C6	2

Reconocimiento de dominios del extremo amino de CD22

La región extracelular de CD22 contiene 7 dominios de tipo inmunoglobulina, de los cuales los 2 dominios de tipo Ig del extremo amino pueden ser particularmente importantes para la unión del ligando a CD22. Para cartografiar los dominios a los que se unen los anticuerpos humanos, se preparó una construcción recombinante en la que solo los dominios 1 y 2 del extremo amino del ECD se fusionaron a las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de IgG de ratón. La proteína de fusión resultante, designada CD22 d1d2-mFc, se expresó en células CHO y se purificó para su uso en los ensayos de unión. Los anticuerpos humanos, que habían mostrado anteriormente su unión al ECD completo de CD22, se analizaron a continuación para determinar su capacidad de unirse a CD22 d1d2-mFc.

El anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón se revistió en placas ELISA de 96 pocillos a 5 µg/ml. Tras incubar durante la noche a 4 °C, se lavaron las placas y se añadió el CD22 d1d2-mFc a cada pocillo a 2 µg/ml seguido por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar la placa, bloqueo con albúmina de suero de bovino al 5 % y lavado de nuevo, se añadieron los anticuerpos de ensayo a 10 µg/ml. Tras incubar durante una hora, se lavaron las placas y se añadió anticuerpo de cabra conjugado con HRP dirigido contra IgG humana a cada pocillo. Tras una hora más de incubación, se lavaron las placas de nuevo y se unieron al conjugado de HRP detectado mediante la adición de sustrato TMB, incubando hasta que se reveló el color y deteniendo con ácido clorhídrico 1 M. A continuación se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450 nm.

Los resultados (Figura 15) mostraron que los anticuerpos se dividieron en dos grupos. El grupo 1, representado por 23C6, 19A3, y los derivados recombinantes de 19A3, CD22.1 y CD22.2 se unieron a CD22 d1d2-mFc mientras que el grupo 2 representado por 12C5 y 16F7 no lo hicieron. Esto sugiere que 12C5 y 16F7 reconocen epítomos en el exterior de ECD de CD22 para los dominios del extremo amino.

Análisis FACS de CD22 expresada sobre superficies celulares

Se confirmó también la unión de CD22.1 y CD22.2 a CD22 mediante citometría de flujo. Células CHO transfectadas con CD22 de longitud completa (CHO-CD22) o células Raji se volvieron a suspender en tampón FACS a 2×10^5 células/pocillo, y después aglomerar las células, se tituló el anticuerpo en los pocillos comenzando a 10 µg/ml y diluyendo en serie 1:3. Tras mezclar e incubar en hielo durante 45 minutos, se añadió el tampón FACS y se lavaron las células 4 veces. Tras el lavado, se añadió anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con PE, y tras una incubación adicional de 30 minutos en hielo, se lavaron las células de nuevo 4 veces antes de volverse a suspender en tampón FACS, leyendo la fluorescencia PE en una máquina de matriz FACS. Los resultados (Figuras 13 y 14) mostraron que CD22.1 y CD22.2 se unían fuertemente y de forma equivalente a los transfectantes CHO-CD22 y a las células Raji.

La unión de 4G6 y 21F6 a CD22 expresada sobre las superficies de las células Raji y células CHO transformadas con CD22 se analizó mediante análisis FACS. Los resultados demostraron que se obtuvo un alto nivel de unión celular. Véanse las Figuras 21, 22 A y 22B. Ningún anticuerpo fue capaz de unirse a células CHO sin la transfección con CD22.

Ejemplo 4: Internalización de anticuerpos dirigidos contra CD22

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 de internalizarse en células que expresan CD22, se usó un ensayo de internalización Hum-ZAP con la línea de células Raji de linfoma de Burkitt, que expresa CD22. Los ensayos Hum-ZAP analizan la internalización de un anticuerpo primario mediante la unión de un anticuerpo secundario con afinidad por la IgG humana conjugada a la toxina saporina.

Las células Raji que expresaban CD22 se sembraron a $2,0 \times 10^4$ células/pocillo (35 µl/pocillo). Los anticuerpos dirigidos contra CD22 se añadieron a los pocillos a 1,5 µg/ml (35 µl/pocillo). Se usó medio solo como control negativo. El reactivo Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25) se añadió a continuación a una concentración de 3,0 µg/ml (35 µl/pocillo) a la mitad de los pocillos mientras que la otra mitad de los pocillos recibieron solo medio. Se incubaron las placas durante 72 horas a 37°C. Se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, n.º G7571). El tampón CellTiter-Glo se mezcló con sustrato CellTiter-Glo y se añadieron 100 µl de la mezcla a cada pocillo. Se detectó la luminiscencia utilizando un luminómetro de microplacas Veritas y el software Veritas (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA) según las instrucciones del fabricante.

Se ensayaron doce anticuerpos dirigidos contra CD22 diferentes y todos presentaron la capacidad de internalizarse. Los resultados de los cuatro anticuerpos que se caracterizaron estructuralmente en el Ejemplo 2 se muestran en el gráfico de barras de la Figura 9. Tal y como se ilustra en la figura 9, se observó una disminución notable de la viabilidad de las células Raji en todos los pocillos que contenían anticuerpos dirigidos contra CD22 y reactivo HumZAP, incluyendo pocillos con el control positivo, mientras que la viabilidad celular no se vio afectada en pocillos que contenían solo los anticuerpos dirigidos contra CD22 sin reactivo HumZAP, lo que demuestra que los anticuerpos dirigidos contra CD22 no estimulan la muerte celular por sí mismos. Según se esperaba, en ausencia de anticuerpos dirigidos contra CD22, el control negativo (con respecto al medio) no muestra ninguna muerte celular en

presencia o ausencia de reactivo HumZAP. Estos datos demuestran que los anticuerpos dirigidos contra CD22 se internalizan eficazmente y que la liberación de la saporina en el interior de las células es responsable de la muerte de las células Raji que expresan CD22 en presencia de reactivo HumZAP.

5 Ejemplo 5: Evaluación de la actividad ADCC de los anticuerpos dirigidos contra CD22

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 para destruir líneas de células CD22+ en presencia de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), se utilizó un ensayo de citotoxicidad mediante fluorescencia.

10 Se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre completa del siguiente modo. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana a partir de sangre completa heparinizada mediante separación de Ficoll-paque normalizada. Las células se volvieron a suspender en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % (inactivado térmicamente) y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante la noche a 37 °C. El día siguiente, las
15 células se recogieron y se lavaron cuatro veces en medio de cultivo y se volvieron a suspender a 1×10^7 células/ml. Las células CD22+ diana se incubaron con reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 µl de BATDA por 1×10^6 células diana/ml durante 20 minutos a 37° C. Las células diana se lavaron cuatro veces, se centrifugaron y se llevaron hasta un volumen final de 1×10^5 células/ml.

20 Las líneas de células Raji CD22+ (linfoma de Burkitt de linfocitos B humanos; ATCC N.º de registro CCL-86) y Daudi (linfoma de Burkitt de linfocitos B humanos; ATCC N.º de registro CCL-213) se ensayaron para la ADCC específica de anticuerpos en los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD22 utilizando el análisis de emisión de fluorescencia Delfia del siguiente modo. Cada línea de células diana (100 µl de células diana marcadas, 10^4 células/pocillo) se incubaron con 50 µl de células efectoras (10^6 células/pocillo) y 50 µl de anticuerpo (10 µg/ml de concentración final). Se usó una relación de diana a efector de 1:50 en todos los experimentos. En todos los
25 estudios, se usó un control del isotipo de IgG1 humana como control negativo. Las células se centrifugaron a 2000 rpm y se incubaron durante una hora a 37 °C. A continuación se recogieron los sobrenadantes, se sometieron a centrifugación y 20 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa de fondo plano, a la cual se añadieron 180 µl de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se leyeron en un lector RubyStar (BMG Labtech). El % de lisis se calculó del siguiente modo: (liberación de la muestra - liberación espontánea * 100) / (liberación máxima - liberación espontánea), donde la liberación espontánea es la fluorescencia procedente de los pocillos que contienen las células diana más las células efectoras y la liberación máximo es la fluorescencia procedente de los pocillos que contienen las células diana y se han tratado con Triton-X al 2 %.

35 Para los ensayos ADCC de células Raji y Daudi, se ensayaron trece anticuerpos dirigidos contra CD33 diferentes junto con los anticuerpos negativos y positivos (hlgG1 y CD20, respectivamente). En cada ensayo, diez de los trece anticuerpos dirigidos contra CD22 presentaron niveles de actividad ADCC iguales o mayores que el anticuerpo del control positivo. Los resultados de los cuatro anticuerpos que se caracterizaron estructuralmente en el Ejemplo 2 se muestran en los gráficos de las Figuras 10A (células Daudi) y 10B (células Raji), que muestran el % de lisis celular.
40 Los datos demuestran que se pueden seleccionar anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 que presentan actividad ADCC, aunque el grado de citotoxicidad de cada anticuerpo frente a células CD22+ puede diferir dependiendo de qué línea de células se usa como célula diana.

Ejemplo 6: Estimulación del flujo de calcio por los anticuerpos dirigidos contra CD22

45 Para evaluar la capacidad de los anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 para estimular el flujo de calcio en células CD22+, se usó el siguiente ensayo del flujo de calcio. Se contaron células Ramos viables (ATCC n.º de registro CRL-1596) mediante microscopía de exclusión del azul tripán y se diluyeron a 2×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI + FBS al 10 %. A partir de esta suspensión celular, 2×10^5 células (100 µl/pocillo) se dispensaron en
50 todos los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo transparente con superficie negra de Poli D-Lisina (Coming n.º 3667). Se añadió colorante de carga (Molecular Devices n.º de catálogo R7181) a la suspensión celular, 100 µl/pocillo. La placa se centrifugó a 1100 rpm durante 4 minutos y a continuación se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se prepararon diluciones en serie de cinco veces de anticuerpos dirigidos contra CD22 e isotipo de IgG1 humano del control, desde 50 µg/ml a 40 ng/ml, en Componente B (Molecular Devices n.º R7181) + tampón BSA al
55 0,1 %. Se dispensaron anticuerpos por triplicado en las hileras A-F de la placa de 96 pocillos anteriormente preparada. Se dispensó el componente B + BSA al 0,1 % en todos los pocillos de las hileras G y H en la placa de ensayo. Se evaluó el flujo de calcio utilizando una Flex Station (Molecular Devices), añadiendo 22 µl de reactivo por pocillo a la placa de ensayo en 17 segundos. Se analizaron los datos como FI Max-Min y se representaron gráficamente frente a la concentración de anticuerpo utilizando GraphPad™ PRISM, regresión no lineal, respuesta a la dosis sigmoidal, pendiente variable.

Se evaluaron diecisiete anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 en el ensayo. Los resultados mostraron que ninguno de los diecisiete anticuerpos dirigidos contra CD22 ensayados estimularon un flujo de calcio significativo, en comparación con el control del isotipo de la IgG1 humana o el tampón solo. Se había mostrado anteriormente en
65 células Ramos un flujo de calcio en respuesta a la estimulación de BCR con F(ab')₂ de cabra dirigido contra IgM humana.

Ejemplo 7: Modulación de los efectos inducidos por la estimulación de BCR por anticuerpos dirigidos contra CD22

En este ejemplo, se examinó la capacidad del anticuerpo dirigido contra CD22 inmovilizado para modular los efectos inducidos por la estimulación del receptor de linfocitos B (BCR). En el ensayo, los anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 y el control del isotipo de la IgG1 humana se diluyeron en 5 µg/ml en RPMI + FBS al 10 % y se dispensaron 100 µl/pocillo por triplicado en placas de fondo plano de 1 microlitro (Corning n.º 7416). Tras incubación durante la noche a 4 °C, las placas se lavaron una vez con PBS frío, a continuación una vez con RPMI 1640 (Mediatech) + FBS al 10 % (GIBCO). Se contaron las células Ramos viables (ATCC n.º de registro CRL-1596) mediante microscopía de exclusión del azul tripán y se diluyeron a 2×10^5 células/ml en RPMI + FBS al 10 %. Se dispensaron 20.000 células (50 µl /pocillo) en las placas de 96 pocillo revestidas con anticuerpos. Se diluyó F(ab')₂ dirigido contra IgM humana (Jackson n.º de catálogo 109-006-129) en 5 µg/ml en RPMI + FBS al 10 % y se dispensaron 100 µl/pocillo para una concentración final de 2,5 µg/ml. Las placas de ensayo se incubaron 72 horas. Se evaluó la viabilidad celular con la adición de reactivo CellTiter-Glo (Promega G7571), 100 µl/pocillo, durante 15 minutos. Se midió la luminiscencia utilizando la placa de ensayo 1 de luminiscencia Nunc96 en Pherastar GMB Labtech. Se analizaron los datos como % de muerte celular con respecto al control del isotipo de la IgG1 humana, que representa el 100 % de viabilidad celular.

Se ensayaron diecisiete anticuerpos dirigidos contra CD22 diferentes en el ensayo y este panel presentó un amplio intervalo de actividad, que variaba desde un valor de muerte celular en % observado de aproximadamente 80 % a un valor de muerte celular en % observado aproximadamente igual al control del isotipo, dependiendo del anticuerpo concreto. Los resultados de los cuatro anticuerpos que se caracterizaron estructuralmente en el Ejemplo 2 se muestran en el gráfico de barras de la Figura 11, que muestra que 19A3, 23C6 y 12C5 inmovilizados potenciaron cada uno de forma potente los efectos antiproliferativos de la estimulación de la muerte celular debida a BCR mientras que 16F7 no difiere significativamente del control del isotipo.

Ejemplo 8: Efectos de los anticuerpos dirigidos contra CD22 sobre la proliferación celular

En este ejemplo, se examinaron los efectos directos de los anticuerpos solubles dirigidos contra CD22 sobre la proliferación celular, con o sin reticulación del anticuerpo. En el ensayo utilizado, se contaron las células Ramos viables (ATCC n.º de registro CRL-1596) mediante microscopía de exclusión del azul tripán y se diluyeron a 2×10^5 células/ml en RPMI + FBS al 10 %. Se dispensaron 20.000 células (50 µl /pocillo) en las tratadas placas de cultivo de 96 pocillos tratadas. El anticuerpo reticulante Fc de cabra dirigido contra IgG humana (Rockland catálogo n.º 709-1117) se diluyó en 80 µg/ml en RPMI + FBS al 10 % y se dispensaron 25 µl/pocillo en la mitad de placas de ensayo de células Ramos. Se dispensó diluyente solo (25 µl/pocillo) en el resto de la placa. Se diluyeron anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 y el control del isotipo de la IgG1 humana en 20 µg/ml en RPMI + FBS al 10 % y se dispensaron 25 µl/pocillo por triplicado en los pocillos que contenían células Ramos más el reticulante y células Ramos más el diluyente de tal manera que las concentraciones finales del anticuerpo fueron de 5 µg/ml de anticuerpo dirigido contra CD22 +/-20 µg/ml de anticuerpo de reticulación. Las placas de ensayo se incubaron al 37° durante 72 horas. Se evaluó la viabilidad celular con la adición de reactivo CellTiter-Glo (Promega G7571), 100 µl/pocillo, durante 10 minutos. Se midió la luminiscencia utilizando la placa de ensayo 1 de luminiscencia Nunc96 en Pherastar GMB Labtech. Se analizaron los datos como % de inhibición del crecimiento con respecto al control del isotipo de la IgG1 humana, que representó un 0 % de inhibición.

Se evaluaron diecisiete anticuerpos humanos dirigidos contra CD22 en el ensayo. Los resultados mostraron que ninguno de los diecisiete anticuerpos dirigidos contra CD22 estudiados alteraron significativamente la tasa de proliferación de células Ramos, tanto cuando los anticuerpos no se reticularon como cuando se reticularon. Estos resultados indican que ninguno de los anticuerpos dirigidos contra CD22 tienen un efecto antiproliferativo directo sobre las células Ramos, incluso si el anticuerpo está reticulado.

Ejemplo 9: Evaluación de la actividad CDC de los anticuerpos dirigidos contra CD22

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos solubles dirigidos contra CD22 para mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En el ensayo utilizado, se contaron las células Ramos viables (ATCC n.º de registro CRL-1596) mediante la microscopía de exclusión del azul tripán y se diluyeron a 1×10^6 células/ml en tampón CDC (RPMI 1640 + BSA al 0,1 % + HEPES 20 mM + Pen/strep al 1 %). La suspensión celular se dispuso como 50.000 células (50 µl/pocillo) en una placa tratada de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos. El complemento humano (Quidel n.º de catálogo A113) se inactivó térmicamente incubando 1 h a 56 °C. El complemento activo e inactivado térmicamente se diluyeron cada uno 1:3 en tampón CDC y se dispensaron 50 µl/pocillo en las placas de ensayo Ramos. Anticuerpos humanos dirigidos contra CD22, control del isotipo de la IgG1 humana y un anticuerpo del control positivo dirigido contra CD20 se diluyeron, cada uno de ellos, a 40 µg/ml en tampón CDC. Se dispensaron 50 µl/pocillo de los anticuerpos diluidos por duplicado en las placas de ensayo Ramos con complemento activo e inactivado térmicamente de tal manera que la concentración final del anticuerpo fue de 10 µg/ml. Se incubaron las placas de ensayo 2 h a 37 °C. Para analizar la viabilidad celular se añadieron 50 µl/pocillo de reactivo azul alamar (BioSource n.º de catálogo DAL1100) y las placas se incubaron 21 h más a 37 °C. se evaluó la viabilidad celular siendo proporcional a la medida de la fluorescencia utilizando el lector de placas de fluorescencia

SPECTROMAX GEMINI (Molecular Devices S/N G 02243).

Se ensayaron dieciocho anticuerpos diferentes dirigidos contra CD22, junto con, como control positivo, un anticuerpo dirigido contra CD20 conocido por presentar una sólida citotoxicidad en presencia de complemento activo, pero no inactivado térmicamente. Los resultados mostraron que ninguno de los anticuerpos dirigidos contra CD22 ensayados presentaron actividad CDC significativa en comparación con el control del isotipo de la IgG1 humana.

Ejemplo 10: Inhibición de la proliferación de células tumorales sólidas *in vivo* por los conjugados de fármacos-anticuerpo dirigidos contra CD22

Para determinar si los conjugados de fármacos de CD22.1 y CD22.2 podrían prepararse de tal manera que pudieran inhibir eficazmente la proliferación de un tumor sólido establecido *in vivo*, los anticuerpos CD22.1 y CD22.2 recombinantes dirigidos contra CD22 se conjugaron con la citotoxina A del fármaco citotóxico y se examinaron las eficacias de los compuestos ADC resultantes utilizando un modelo de célula tumoral subcutánea Ramos.

Conjugación de CD22.1 y CD22.2 con la citotoxina A del compuesto citotóxico

CD22.1 y CD22.2 se concentraron hasta aproximadamente 5 mg/ml, se intercambió el tampón en tampón fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, DTPA 2 mM, glicerol al 3 %, pH 7,5 y tiolado con un exceso molar de 14 veces de 2-Iminotiolano durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras la tiolación, el anticuerpo se intercambió con tampón en tampón HEPES 50 mM, que contenía glicina 5 mM, DTPA 2 mM, y Povidona al 0,5 % (10 K) pH 5,5. Se cuantificó la tiolación con 4,4"-ditiopiridina midiendo la liberación de tiopiridina a 324 nM. Se consiguió la conjugación mediante adición de citotoxina A a una relación molar 3:1 de citotoxina A a tioles. La incubación fue a temperatura ambiente durante 60 minutos seguido por el bloqueo de cualesquiera tioles residuales mediante la adición de una relación molar de 10. T de N-etilmaleimida a tioles con la mezcla de reacción.

Los conjugados resultantes se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Cada mezcla de reacción se filtró y cargó en una columna de alto rendimiento de Sefarosa-SP equilibrada con tampón A (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, povidona al 0,5 % (10K), pH 5,5). Los conjugados de anticuerpos se eluyeron con tampón B al 24 % (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1 M, povidona al 0,5 % (10K), pH 5,5). Las fracciones que contenían un conjugado monomérico de anticuerpo-citotoxina A se combinaron y dializaron frente a HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 100 mM, povidona al 0,5 % (10 K), pH 6,0. Se determinaron relaciones de sustitución midiendo la absorbancia a 280 y 340 nm y se analizaron los conjugados mediante SEC-HPLC.

Se preparó un conjugado de CD22.1-citotoxina A con una relación de sustitución de 1,7 y se preparó un conjugado de CD22.2 con una relación de sustitución de 1,6.

Eficacia *in vivo* de conjugados de fármacos anticuerpo dirigidos contra CD22 CD22.1-citotoxina A y CD22.2-citotoxina A

Ratones SCID recibieron implantes vía subcutáneos de células Raji a 10 millones de células por ratón en matrigel, y se dejó a los tumores crecer hasta que estuvieron bien establecidos, con un tamaño medio de aproximadamente 190 mm³. A continuación se trataron grupos de 8 ratones con una única dosis tanto de citotoxina A-anticuerpo CD22.1, conjugado de citotoxina A-CD22.2, un conjugado de citotoxina A-IgG1 humana del control, que no se une a células Raji, o con vehículo solo.

Se vigiló el tamaño del tumor durante 63 días después de la dosificación, o hasta que se sometieron a eutanasia los animales debido a un crecimiento del tumor más allá de 1500 mm³. Se administró citotoxina A-CD22.1 a 0,18 µmol/kg de equivalente de fármaco, y se administraron citotoxina A-CD22.2 y ab-citotoxina A del control a 0,3 µmol/kg de equivalente de fármaco. Los resultados demostraron una buena eficacia antitumoral para los conjugados de CD22.1 y CD22.2 (Figura 16).

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	V _H CDR1 a.a. 12C5	31	V _H a.a. 12C5
2	V _H CDR1 a.a. 19A3	32	V _H a.a. 19A3
λ	V _H CDR1 a.a. 16F7	33	V _H a.a. 16F7
4	V _H CDR1 a.a. 23C6	34	3-3-23G6 de V _H

ES 2 678 060 T3

5	V _H CDR2 a.a. 12C5	35	V _K a.a. 12C5
6	V _H CDR2 a.a. 19A3	36	V _K a.a. 19A3
7	V _H CDR2 a.a. 16F7	37	V _K .1 a.a. 16F7
8	V _H CDR2 a.a. 23C6	38	V _K .2 a.a. 16F7
		39	V _K .1 a.a. 23C6
9	V _H CDR3 a.a. 12C5	40	V _K .2 a.a. 23C6
10	V _H CDR3 a.a. 19A3		
11	V _H CDR3 a.a. 16F7	41	V _H n.t. 12C5
12	V _H CDR3 a.a. 23C6	42	V _H n.t. 19A3
		43	V _H n.t. 16F7
13	CDR1 V _K a.a. 12C5	44	V _H n.t. 23C6
14	CDR1 V _K a.a. 19A3		
15	CDR1 V _K .1 a.a. 16F7	45	V _K n.t. 12C5
16	CDR1 V _K .2 a.a. 16F7	46	V _K n.t. 19A3
17	CDR1 V _K .1 a.a. 23C6	47	V _K .1 n.t. 16F7
18	CDR1 V _K .2 a.a. 23C6	48	V _K .2 n.t. 16F7
		49	V _K .1 n.t. 23C6
19	CDR2 V _K a.a. 12C5	50	V _K .2 n.t. 23C6
20	CDR2 V _K a.a. 19A3		
21	CDR2 V _K .1 a.a. 16F7	51	V _H 7-4.1 de la línea germinal a.a.
22	CDR2 V _K .2 a.a. 16F7	52	V _H 4-34 de la línea germinal a.a.
23	CDR2 V _K .1 a.a. 23C6	53	V _H 5-51 de la línea germinal a.a.
24	CDR2 V _K .2 a.a. 23C6	54	V _H 1-69 de la línea germinal a.a.
25	CDR3 V _K a.a. 12C5	55	V _L 2b2 de la línea germinal a.a.
26	CDR3 V _K a.a. 19A3	56	V _K L6 de la línea germinal a.a.
27	CDR3 V _K .1 a.a. 16F7	57	V _K A27 de la línea germinal a.a.
28	CDR3 V _K .2 a.a. 16F7	58	V _K A10 de la línea germinal a.a.
29	CDR3 V _K .1 a.a. 23C6		
30	CDR3 V _K .2 a.a. 23C6	59	CD22 humana (NP_001762)
60	V _H CDR2 a.a. CD22.2	61	V _H a.a. CD22.2
		62	V _H n.t. CD22.2
63	V _H CDR1 a.a. 4G6	81	V _H a.a. 4G6
64	CDR1 V _{H1} a.a. 21F6	82	V _H , a.a. 21F6
65	CDR1 V _{H2} a.a. 21F6	83	V _{H2} 3.3. 21F6

66	V _H CDR2 a.a. 4G6	84	V _{K1} a.a. 4G6
67	CDR2 V _{H1} a.a. 21F6	85	V _{K2} a.a. 4G6
68	CDR2 V _{H2} a.a. 21F6	86	V _K a.a. 21F6
69	V _H CDR3 a.a. 4G6		
70	CDR3 V _{H1} a.a. 21F6	87	V _H n.t. 4G6
71	CDR3 V _{H2} a.a. 21F6	88	V _{H1} n.t. 21F6
		89	V _{H2} n.t. 21F6
72	V _{K1} CDR1 a.a. 4G6		
73	V _{K2} CDR1 a.a. 4G6	90	V _{K1} n.t. 4G6
74	VCDR1 _K a.a. 21F6	91	V _{K2} n.t. 4F6
		92	V _{K2} n.t. 21F6
75	V _{K1} CDR2 a.a. 4G6		
76	V _{K2} CDR2 a.a. 4G6	93	V _{K1} L18 de la línea germinal a.a.
77	CDR2 V _K a.a. 21F6		
		94	Enlazador peptídico
78	V _{K1} CDR3 a.a. 4G6	95	Enlazador peptídico
79	V _{K2} CDR3 a.a. 4G6	96	Enlazador peptídico
80	CDR3 V _K a.a. 21F6	97	Enlazador peptídico
		98	Enlazador peptídico
		99	Enlazador peptídico
		100	Enlazador peptídico
		101	Enlazador peptídico
		102	Enlazador peptídico
		103	Enlazador peptídico
		104	Enlazador peptídico
		105	Enlazador peptídico
		106	Enlazador peptídico
		107	Enlazador peptídico
108	12C5 JH6b de la línea germinal	118	VH1 de la línea germinal 21F6 4-34
109	JL2 de la línea germinal	119	VH1 de la línea germinal 21F6 JH4b
110	JK1 de la línea germinal	120	VH2 de la línea germinal 21F6 4-34
111	JK4b de la línea germinal	121	VH2 de la línea germinal 21F6 JH4b
112	JK3b de la línea germinal	122	VK de la línea germinal 21F6 L6
113	JK1 de la línea germinal	123	VK de la línea germinal 21F6 JK4
114	JK2 de la línea germinal	124	VH de la línea germinal 4G6 1-69
115	2-15 de la línea germinal	125	VH de la línea germinal 4G6 JH4b

116	JK1 de la línea germinal	126	VK1 de la línea germinal 4G6 JK2
117	JH4b de la línea germinal	127	VK2 de la línea germinal 4G6 A27
		128	VK2 de la línea germinal 4G6 JK4

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Medarex, Inc.
King, David J.
Witte, Alison
LeBlanc, Heidi N.
Theolis, Richard
Masood , Asna
10 Yamanaka, Mark
Emory, Kyra D.
Dwiggins, Sara R.
Sproul, Tim
Rao-Naik, Chetana
15 Passmore, David

<120> Anticuerpos humanos que se unen a CD22 y usos de los mismos

<130> 077375.0549

20 <150> US 60/868.231
<151> 01-12-2006

<160> 128

25 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 5
30 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

35

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
40 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

45

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

5 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

Ser Tyr Gly Ile Asn
1 5

10 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

20 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

Asp Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

30 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 7

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

40 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 8

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

Gly

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

Leu Phe Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

Thr Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr
1 5 10

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

Pro Thr Tyr Tyr Phe Gly Ser Val Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

Asp Gln Gly Val Val Val Val Ala Ala Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

	Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser
	1 5 10
5	<210> 14 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 14
10	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala 1 5 10
15	<210> 15 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 15
20	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala 1 5 10
25	<210> 16 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 16
30	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His 1 5 10
35	<210> 17 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 17
40	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala 1 5 10
45	<210> 18 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 18
50	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Phe Leu Ala 1 5 10
	<210> 19 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 19

		Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser
		1 5
5	<210> 20 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
10		Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
		1 5
15	<210> 21 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21	
20		Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
		1 5
25	<210> 22 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 22	
30		Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
		1 5
35	<210> 23 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
40		Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
		1 5
45	<210> 24 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 24	
50		Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
		1 5
	<210> 25 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	

		Cys Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Thr Leu Val
		1 5 10
5	<210> 26	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 26	
10		Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
		1 5
	<210> 27	
	<211> 9	
15	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27	
20		Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Thr
		1 5
	<210> 28	
	<211> 9	
	<212> PRT	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 28	
30		His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Thr
		1 5
	<210> 29	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 29	
40		Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
		1 5
	<210> 30	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 30	
45		Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
		1 5
	<210> 31	
	<211> 119	
50	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 31	

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asn	Thr	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Ala	Gln	Gly	Phe	
	50					55					60					
Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Leu	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115														

<210> 32
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

ES 2 678 060 T3

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Gly Thr Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr Trp
100 105 110

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Thr	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 34
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Gly Val Val Val Val Ala Ala Thr His Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr

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

<210> 36
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 37

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

10

<210> 38
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 38

ES 2 678 060 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 39

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Phe
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 357
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

cagggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact agttatgcta tgaattgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacca aactgggaa cccaacgtat 180
gcccagggtc tcacaggacg gtttgtcttc tccttggaaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc taggttattc 300
tactactact tcggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 42
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtag gtccttcagt agttactact ggagctggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggac atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcggg aacgttttac 300
gatattttga ctggttatta tccccttggg taactggggcc cggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 43
<211> 363
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 43

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata caactttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
ccggggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gaccccgacg 300
tattactttg gttcgggtggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tca 363

<210> 44
<211> 384
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 44

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaaaaaga ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatggta tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgaatg gatgggagag atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcag 300
ggtgtagtgg tggtagctgc aaccactac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 45
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 45

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgatgttggg agttataacc ttgtctcctg gtaccaactg 120
 caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggtca gtaagcggcc ctgaggggtt 180
 tctaatacgt tctctggctc caggtctggc aacacggcct ccctgacaat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc tgctcatatg caaatagtag cactttggta 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 46
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccctacgtt cggccaaggg 300
 accaagggtg aaatcaaa 318

<210> 47
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 48
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 49
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 50
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc aacttcttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 51
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

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

Ala Arg

<210> 52
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 52

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg

<210> 53
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 54
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 55
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

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

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Ser Thr

<210> 56
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 57

<211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

Pro

10 <210> 58
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 58

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

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

<210> 59
 <211> 847
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
 20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
 35 40 45

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

Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
 85 90 95

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
 100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
 115 120 125

Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
 130 135 140

Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
 165 170 175

Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser
 180 185 190

Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
 195 200 205

Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
 210 215 220

Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
 225 230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg
 245 250 255

Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro
 260 265 270

Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys
 275 280 285

Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser
 290 295 300

Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser
 305 310 315 320

Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
 325 330 335

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu
 340 345 350

Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His
 355 360 365

Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro
 370 375 380

Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn
 385 390 395 400

Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln
 405 410 415

Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
 420 425 430

Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn
 435 440 445
 Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu
 450 455 460
 Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
 465 470 475 480
 Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
 485 490 495
 Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys
 500 505 510
 Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
 515 520 525
 Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu
 530 535 540
 Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser
 565 570 575
 Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala
 580 585 590
 Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu
 595 600 605
 Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val
 610 615 620
 Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His
 625 630 635 640
 Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala
 645 650 655
 Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
 660 665 670

Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val
675 680 685

Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys
690 695 700

Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
705 710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
725 730 735

Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr
740 745 750

Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro
755 760 765

Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
770 775 780

Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
785 790 795 800

Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
805 810 815

Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
820 825 830

Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
835 840 845

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Asp Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 61
<211> 122

ES 2 678 060 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

5

```

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

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

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

Gly Asp Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50          55          60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80

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

Gly Thr Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr Trp
          100          105          110

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 62
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 62

10

```

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcgctg tctatggtag gtccttcagt agttactact ggagctggat ccgccagccc      120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggac atccaacata gtggaagcac caactacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggaacac gctgtgtatt actgtgcggg aacgttttac      300
gatattttga ctggttatta tccccttggg tactggggcc cggaaccctt ggtcaccgtc      360
tcctca                                           366

```

15

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 63

Asn Tyr Ala Ile Ser
1 5

5 <210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 64

Gly His Tyr Trp Ser
1 5

15 <210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 65

Gly His Tyr Trp Ser
1 5

25 <210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Ile Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

30 **Gly**

<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Glu Thr Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

40 <210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 68

Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 69
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69
 Ala Pro Thr Tyr Trp Gly Ser Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 70
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70
 Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Phe Asp Ser
 1 5 10
 20
 <210> 71
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 71
 Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Phe Asp Ser Trp Gly
 1 5 10 15
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 20 25
 30
 <210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72
 35
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Gly Leu Ala
 1 5 10
 40
 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 73
 45
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 50
 <210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 74

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Tyr Leu Ala
1 5 10

5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 75

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

15

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 76

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

25

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 77

Asp Val Ser Tyr Arg Ala Thr
1 5

35

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

40

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 79

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

50

<210> 80
<211> 9

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

5

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 81

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 82
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 82

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Phe Asp Ser Trp
100 105 110

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

<210> 83
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 83

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

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

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

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

5

10

ES 2 678 060 T3

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Phe Asp Ser Trp
100 105 110

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

<210> 84
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 84

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 85

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

5 <210> 86
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Val Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Leu Val Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 87
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 87

cagggtccagt tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagc cttctggaga caccttcagc aactatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat ggctatctac 180
gcaccgaagt tcagggcag agttacgatt acogoggaca aatccacgaa cacagccttc 240
atggatctta ccagcctgta ttttgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcccca 300
acttactggg gatcgaagga ctactttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 88
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 88

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggtcactact ggagctggat ccgccagtcc 120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa accgatcata gtggaagcac caactacaat 180
cctgccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaatca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag gacgtattac 300
gatattttga ctgattatta cccctttgac tcctggggcc agggaaccct ggtcacccgc 360
tcctca 366

<210> 89
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggtcactact ggagctggat ccgccagtcc 120
ccaggggaagg gactggagtg gattggggaa atcgatcata gtggaagcac caactacaat 180
cctgccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctatgtatt actgtgcgag gacgtattac 300
gatattttga ctgattatta cccctttgac tcctggggcc agggaaccct ggtcacccgc 360
tcctca 366

<210> 90
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 90

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggacattagc agtggttttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggacagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gacgattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt tcccgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 91
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 91

ES 2 678 060 T3

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca      180
gacagggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a                                              321

```

<210> 92
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 92

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc ggctacttag cctggtacca acagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gtatcctaca gggccactgg catcctagtc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcccatcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a                                              321

```

<210> 93
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 93

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser
85 90

<210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

<400> 94

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

<400> 95

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

<400> 96

Gly Phe Leu Gly
1

5 <210> 97
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador peptídico

<400> 97

Leu Leu Gly Leu
1

15 <210> 98
<211> 4
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Sustrato de triptasa

25 <400> 98

Pro Arg Phe Lys
1

30 <210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Sustrato de triptasa

<400> 99

Thr Arg Leu Arg
1

40 <210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Sustrato de triptasa

<400> 100

50

Ser Lys Gly Arg
1

55 <210> 101
<211> 4
<212> PRT

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sustrato de triptasa		
5	<400> 101		
		Pro Asn Asp Lys	
		1	
10	<210> 102		
	<211> 6		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Sustrato de triptasa		
	<400> 102		
		Pro Val Gly Leu Ile Gly	
20		1	5
	<210> 103		
	<211> 5		
	<212> PRT		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sustrato de triptasa		
30	<400> 103		
		Gly Pro Leu Gly Val	
		1	5
	<210> 104		
35	<211> 8		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
40	<223> Sustrato de triptasa		
	<400> 104		
		Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln	
45		1	5
	<210> 105		
	<211> 4		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> Sustrato de triptasa		
	<400> 105		
55		Pro Leu Gly Leu	
		1	

<210> 106
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sustrato de triptasa
 10 <400> 106

 Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln
 1 5

 15 <210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Sustrato de triptasa

 <400> 107

 Gly Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gln
 1 5

 25 <210> 108
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 108

 Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 1 5 10 15

 Val Ser Ser

 35 <210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 109

 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

 45 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 50 <400> 110

 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 111
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 111

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 112
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 114
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 115

Asp Ile Val Val Val Val Ala Ala Thr
1 5

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 116

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 118
<211> 97
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg

<210> 119
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 120
<211> 97
<212> PRT

ES 2 678 060 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 120

```

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80

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

```

Arg

5

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 121

```

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1          5          10

```

15

<210> 122

<211> 95

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 122

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 123
<211> 11
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 123

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 124
<211> 98
15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 124

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 125
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 125

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 126
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 126

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 127
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 127

ES 2 678 060 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

<210> 128

<211> 11

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 128

10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se une a CD22 humano, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:2;
- (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:60;
- (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 10;
- (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 14;
- (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:20; y
- (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:26.

2. El anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:2;
- (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:6;
- (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 10;
- (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 14;
- (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:20; y
- (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:26.

3. El anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:2;
- (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:60;
- (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 10;
- (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 14;
- (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:20; y
- (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:26.

4. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en las SEQ ID NO: 32 o 61; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 36.

5. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 4, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 32; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 36.

6. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 4, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 61; y

- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 36.

- 5 7. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
8. Una composición que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 9. Un inmunoconjugado, que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y una molécula ligando, en el que la molécula ligando es un agente terapéutico, preferentemente una citotoxina.
- 15 10. El inmunoconjugado de la reivindicación 9, en el que el agente terapéutico es un isótopo radioactivo.
11. El inmunoconjugado de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la molécula ligando está conjugada con el anticuerpo mediante un enlazador químico; preferentemente el enlazador químico se selecciona entre el grupo que consiste en enlazadores de peptidilo, enlazadores de hidrazina y enlazadores de disulfuro.
- 20 12. Una composición que comprende el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 25 14. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.
- 30 16. Un método para preparar un anticuerpo dirigido contra CD22, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende expresar el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, en la célula hospedadora de la reivindicación 15 y aislar el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la célula hospedadora.
- 35 17. Uso del anticuerpo, o de la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD22 mediante la puesta en contacto de la célula tumoral que expresa CD22 con el anticuerpo, la porción de unión a antígeno del mismo o el inmunoconjugado, de tal forma que el crecimiento de la célula tumoral que expresa CD22 queda inhibido.
- 40 18. El uso de la reivindicación 17, en el que la célula tumoral es una célula de un linfoma de linfocitos B; preferentemente una célula de un linfoma no de Hodgkin.
19. Uso del anticuerpo, o de la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o del inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto.
- 45 20. El uso de la reivindicación 19, en donde el trastorno autoinmunitario es lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.
- 50 21. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para su uso en la inhibición del crecimiento de una célula tumoral que expresa CD22 mediante la puesta en contacto de la célula tumoral que expresa CD22 con el anticuerpo, la porción de unión a antígeno del mismo o el inmunoconjugado, de tal forma que el crecimiento de la célula tumoral que expresa CD22 queda inhibido.
- 55 22. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno del mismo o el inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 21, en donde la célula tumoral es una célula de un linfoma de linfocitos B; preferentemente una célula de un linfoma no de Hodgkin.
- 60 23. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto.
- 65 24. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno del mismo o el inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 23, en donde el trastorno autoinmunitario es lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.

Anti-CD22 12C5 VH

segmento V: 7-4.1
segmento D: 3-3
segmento J: JH6b

```

      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  S  E  L  K  K  P  G  A  S  V
1  CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                     CDR1
                                     -----
      K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  A  M  N  W
55 AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGT TAT GCT ATG AAT TGG

                                     CDR2
                                     -----
      V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  N  T  N
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AAC ACC AAC

      CDR2
      -----
      T  G  N  P  T  Y  A  Q  G  F  T  G  R  F  V  F  S  L
163 ACT GGG AAC CCA ACG TAT GCC CAG GGC TTC ACA GGA CGG TTT GTC TTC TCC TTG

      D  T  S  V  S  T  A  Y  L  Q  I  S  S  L  K  A  E  D
217 GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTG CAG ATC AGC AGC CTA AAG GCT GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
      T  A  V  Y  Y  C  A  R  L  F  Y  Y  Y  F  G  M  D  V
271 ACT GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGG TTA TTC TAC TAC TAC TTC GGT ATG GAC GTC

      W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
325 TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 1A

Anti-CD22 12C5 Vλ

segmento V: 2b2
segmento J: JL2

```

      Q   S   A   L   T   Q   P   A   S   V   S   G   S   P   G   Q   S   I
1  CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC

                                CDR1
      -----
      T   I   S   C   T   G   T   S   S   D   V   G   S   Y   N   L   V   S
55 ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAT GTT GGG AGT TAT AAC CTT GTC TCC

                                CDR2
      -----
      W   Y   Q   L   H   P   G   K   A   P   K   L   M   I   Y   E   V   S
109 TGG TAC CAA CTG CAC CCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAG GTC AGT

      CDR2
      -----
      K   R   P   S   G   V   S   N   R   F   S   G   S   R   S   G   N   T
163 AAG CGG CCC TCA GGG GTT TCT AAT CGC TTC TCT GGC TCC AGG TCT GGC AAC ACG

      A   S   L   T   I   S   G   L   Q   A   E   D   E   A   D   Y   Y   C
217 GCC TCC CTG ACA ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

                                CDR3
      -----
      C   S   Y   A   N   S   S   T   L   V   F   G   G   G   T   K   L   T
271 TGC TCA TAT GCA AAT AGT AGC ACT TTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC

      V   L
325 GTC CTA

```

FIGURA 1B

Anti- CD22 19A3 VH
Anti- CD22 CD22.1 VH

segmento V: 4-34
segmento D: 3-9
segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L
1  CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
      S  L  T  C  A  V  Y  G  R  S  F  S  S  Y  Y  W  S  W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT AGG TCC TTC AGT AGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
      I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  D  I  N  H  S
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAC ATC AAT CAT AGT

                                CDR2
                                -----
      G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
      A  V  Y  Y  C  A  G  T  F  Y  D  I  L  T  G  Y  Y  P
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG GGA ACG TTT TAC GAT ATT TTG ACT GGT TAT TAT CCC

                                CDR3
                                -----
      L  G  Y  W  G  P  G  T  L  V  T  V  S  S
325 CTT GGG TAC TGG GGC CCG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 2A

Anti- CD22 19A3 VK
 Anti- CD22 CD22.1 VK
 Anti- CD22 CD22.2 VK

segmento V: L6
 segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

FIGURA 2B

Anti- CD22 CD22.2 VH

segmento V: 4-34
segmento D: 3-9
segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L
1  CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                     CDR1
                                     -----
      S  L  T  C  A  V  Y  G  R  S  F  S  S  Y  Y  W  S  W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT AGG TCC TTC AGT AGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                     CDR2
                                     -----
      I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  D  I  Q  H  S
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAC ATC CAA CAT AGT

      CDR2
      -----
      G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                     CDR3
                                     -----
      A  V  Y  Y  C  A  G  T  F  Y  D  I  L  T  G  Y  Y  P
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG GGA ACG TTT TAC GAT ATT TTG ACT GGT TAT TAT CCC

      CDR3
      -----
      L  G  Y  W  G  P  G  T  L  V  T  V  S  S
325 CTT GGG TAC TGG GGC CCG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 2C

Anti-CD22 16F7 VH

segmento V: 5-51
segmento D: 3-10
segmento J: JH3b

```

      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  E  S  L
1  GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
      K  I  S  C  K  G  S  G  Y  N  F  T  S  Y  W  I  G  W
55 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AAC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                -----
      V  R  Q  M  P  G  K  G  L  E  W  M  G  I  I  Y  P  G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
      D  S  D  T  R  Y  S  P  S  F  Q  G  Q  V  T  I  S  A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

      D  K  S  I  S  T  A  Y  L  Q  W  S  S  L  K  A  S  D
217 GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                -----
      T  A  M  Y  Y  C  A  T  P  T  Y  Y  F  G  S  V  A  F
271 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG ACC CCG ACG TAT TAC TTT GGT TCG GTG GCT TTT

                                CDR3
                                -----
      D  I  W  G  Q  G  T  M  V  T  V  S  S
325 GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA

```

FIGURA 3A

Anti-CD22 16F7 VK1

segmento V: A27
segmento J: JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      CDR3
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      Q   Y   G   S   S   P   P   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

FIGURA 3B

Anti-CD22 16F7 VK2

segmento V: A10
segmento J: JK2

E I V L T Q S P D F Q S V T P K E K
1 GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA GAC TTT CAG TCT GTG ACT CCA AAG GAG AAA

CDR1

V T I T C R A S Q S I G S S L H W Y
55 GTC ACC ATC ACC TGC CGG GCC AGT CAG AGC ATT GGT AGT AGC TTA CAC TGG TAC

CDR2

Q Q K P D Q S P K L L I K Y A S Q S
109 CAG CAG AAA CCA GAT CAG TCT CCA AAG CTC CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC

CDR2

F S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 TTC TCA GGG GTC CCC TCG AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC

CDR3

L T I N S L E A E D A A A Y Y C H Q
217 CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GCT GAA GAT GCT GCA GCG TAT TAC TGT CAT CAG

CDR3

S S S L P Y T F G Q G T K L E I K
271 AGT AGT AGT TTA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

FIGURA 3C

Anti-CD22 23C6 VH

segmento V: 1-69
segmento D: 2-15
segmento J: JH6b

```

      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  T  G  S  S  V
1  CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAA AAG ACT GGG TCC TCG GTG

                                CDR 1
                                -----
      K  V  S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  G  I  N  W
55 AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GGT ATC AAC TGG

                                CDR 2
                                -----
      V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  E  I  I  P  I
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAA TGG ATG GGA GAG ATC ATC CCT ATC

                                CDR 2
                                -----
      F  G  T  A  N  Y  A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A
163 TTT GGT ACA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

      D  E  S  T  S  T  V  Y  M  E  L  S  S  L  R  A  E  D
217 GAC GAA TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR 3
                                -----
      T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  Q  G  V  V  V  V  A  A  T
271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CAG GGT GTA GTG GTG GTA GCT GCA ACC

                                CDR 3
                                -----
      H  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V
325 CAC TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC

      S  S
379 TCC TCA

```

FIGURA 4A

Anti-CD22 23C6 VK1

segmento V: L6
segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR 1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR 2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR 2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR 3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR 3
      -----
      R S N W P W T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

FIGURA 4B

Anti-CD22 23C6 VK2

segmento V: L6
segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR 1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S N F L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AAC TTC TTA GCC TGG TAC

                                CDR 2
                                -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR 2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR 3
                                -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR 3
      -----
      R S N W P P T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

FIGURA 4C

Anti-CD22 12C5 VH

7-4.1 lin. germinal Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y A M N W V R
 12C5 VH - - - - - CDR1 - - - - -

7-4.1 lin. germinal Q A P G Q G L E W M G W I N T N T G N P T Y A Q G F T G R F V F S L D T S V
 12C5 VH - - - - - CDR2 - - - - -

7-4.1 lin. germinal S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y C A R - - - - - CDR3 - - - - -
 JH6b lin. germinal Y Y Y Y G M D V W G Q G T T - - - - -
 12C5 VH - - - - - L F - - - - -

JH6b lin. germinal V T V S S - - - - -
 12C5 VH - - - - -

FIGURA 5A

Anti-CD22 12C5 Vλ

2b2 lin. germinal 12C5 VA	Q	S	A	L	T	Q	P	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T	S	S	D	V	G
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR1																													
2b2 lin. germinal 12C5 VA	S	Y	N	L	V	S	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	E	V	S	K	R	P	S	G	V
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR2																													
2b2 lin. germinal 12C5 VA	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR3																													
2b2 lin. germinal JL2 lin. germinal 12C5 VA	C	S	Y	A	G	S	S	T	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	N	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIGURA 5B

[illegible]

FIGURA 6A

Anti- CD22 19A3 VK	
Anti- CD22 CD22.1 VK	
Anti- CD22 CD22.2 VK	
L6 lín. germinal 19A3 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
L6 lín. germinal 19A3 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
L6 lín. germinal 19A3 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N
L6 lín. germinal JK1 lín. germinal 19A3 VK	W P T F G Q G T K V E I K

FIGURA 6B

Anti-CD22 19A3 N57Q VH (CD22.2)

segmento V: 4-34
segmento D: 3-9
segmento J: JH4b

4-34 lin. germinal CD22.2 VH	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L - - - - -
4-34 lin. germinal CD22.2 VH	S L T C A V Y G G S F S <u>CDR1</u> - - - - - R - - - S - - - -
4-34 lin. germinal CD22.2 VH	I R Q P P G K G L E W I G <u>CDR2</u> - - - - - D - Q - -
4-34 lin. germinal CD22.2 VH	<u>CDR2</u> G S T N Y N P S L K S R V T I S V D - - - - -
4-34 lin. germinal CD22.2 VH	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T - - - - -
4-34 lin. germinal CD22.2 VH	A V Y Y C A R <u>CDR3</u> - - - - - G T F Y D I L T G Y Y P
JH4b lin. germinal CD22.2 VH	<u>CDR3</u> D Y W G Q G T L V T V S S L G - - - P - - - - -

FIGURA 6C

Anti-CD22 16F7 VH	
5-51 lín. germinal 16F7 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S P T - N - -
5-51 lín. germinal 16F7 VH	<u>CDR1</u> S Y W I G W V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y - <u>CDR2</u> -
5-51 lín. germinal 16F7 VH	S P S F Q G Q V T I S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D -
5-51 lín. germinal JH3b lín. germinal 16F7 VH	<u>CDR3</u> T A M Y Y C A R - A F D I W G Q G T M V T V S S -

FIGURA 7A

Anti-CD22 16F7 VK1

A27 lin. germinal 16F7 VK1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q	-CDR1-
A27 lin. germinal 16F7 VK1	Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I -	-CDR2-
A27 lin. germinal JK1 lin. germinal 16F7 VK1	S R L E P E D F A V Y Y C Q Y G S S P P	-CDR3- T F G Q G T K V E I K

FIGURA 7B

Anti-CD22 16F7 VK2

A10 lín. germinal 16F7 VK2	E I V L T Q S P D F Q S V T P K E K V T I T C R A S Q S I G S	CDR1
A10 lín. germinal 16F7 VK2	S L H W Y Q Q K P D Q S P K L L I K Y A S Q S F S G V P S R F	CDR2
A10 lín. germinal 16F7 VK2	S G S G S G T D F T L T I N S L E A E D A A T Y Y C H Q S S S	CDR3
A10 lín. germinal JK2 lín. germinal 16F7 VK2	L P Y T F G Q G T K L E I K	

FIGURA 7C

Anti-CD22 23C6 VH	
1-69 lín. germinal 23C6 VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W - - - - - T - - - - - G - N -
1-69 lín. germinal 23C6 VH	V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A - - - - - E - - - - -
1-69 lín. germinal 2-15 lín. germinal 23C6 VH	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R - - - - - V - - - - - A - - - - - D I V V V V A A T - - - - -
JH6b lín. germinal 23C6 VH	Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S H - - - - -

FIGURA 8A

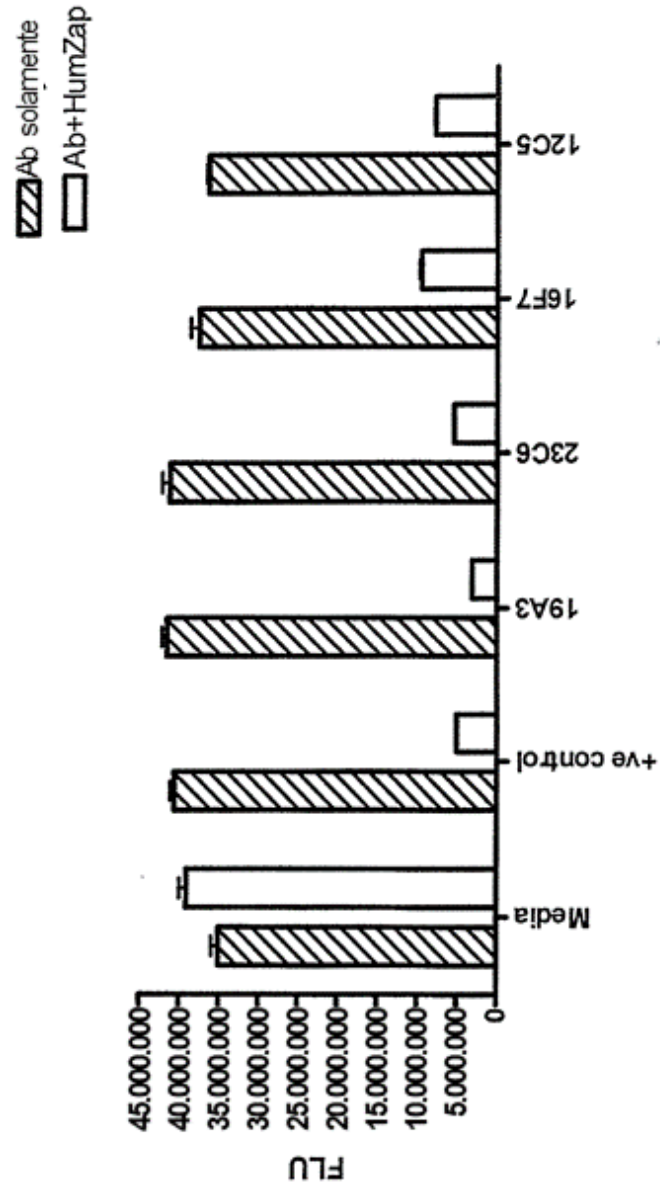


FIGURA 9

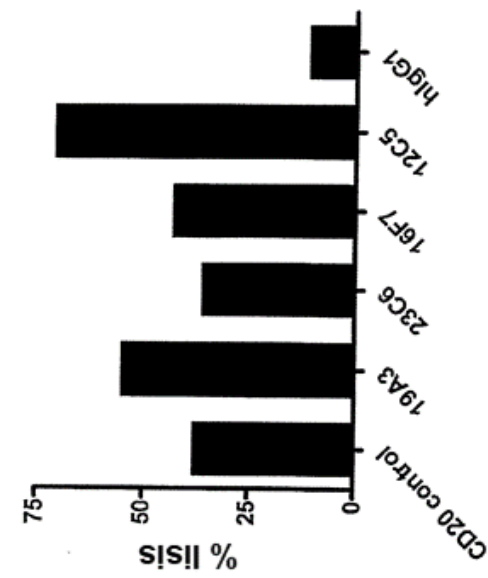


Fig. 10A

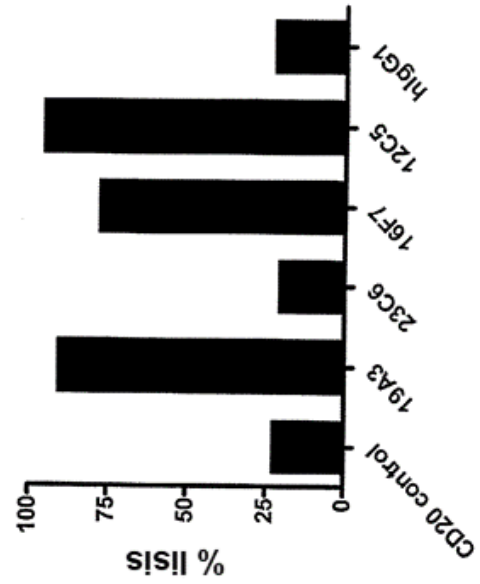


Fig. 10B

FIGURA 11

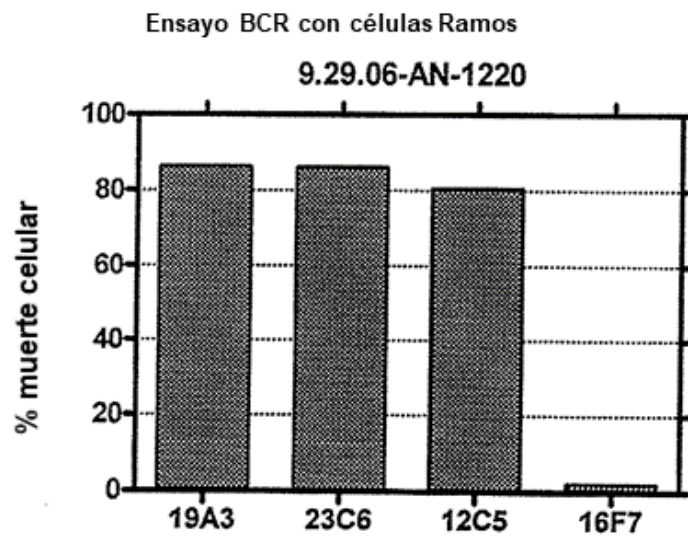


Figura 12

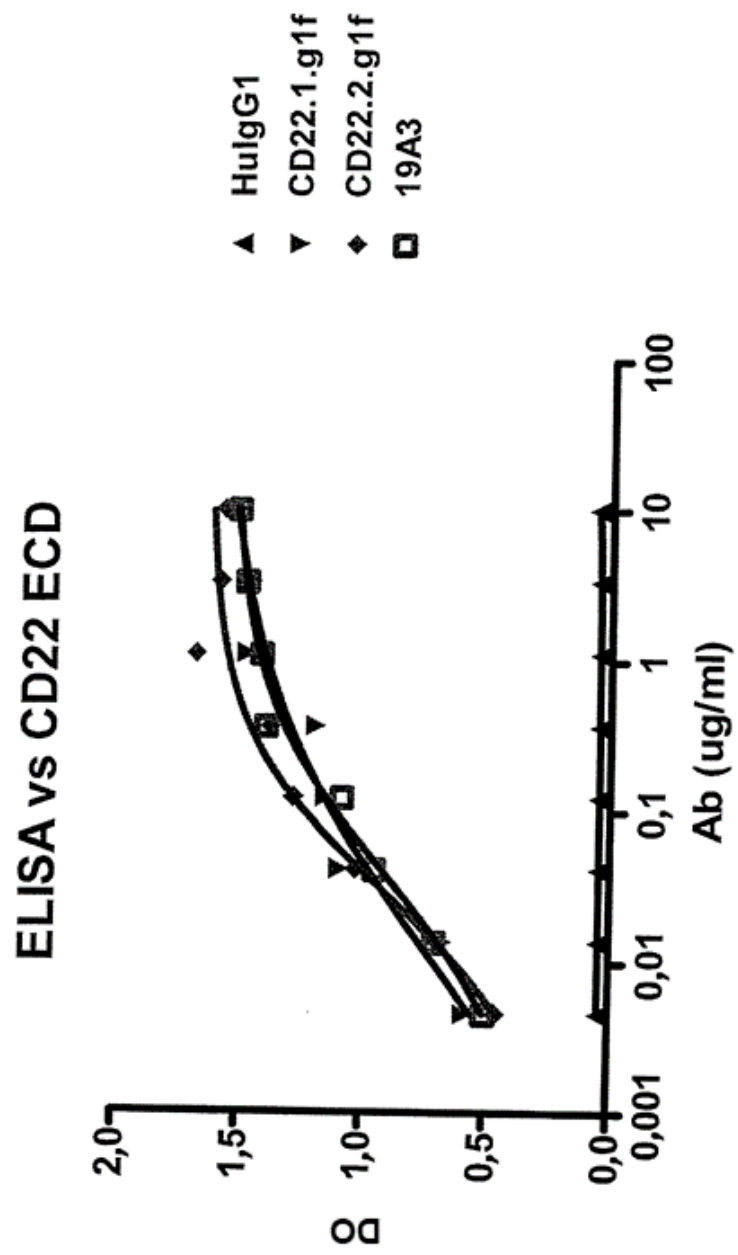


Figura 13

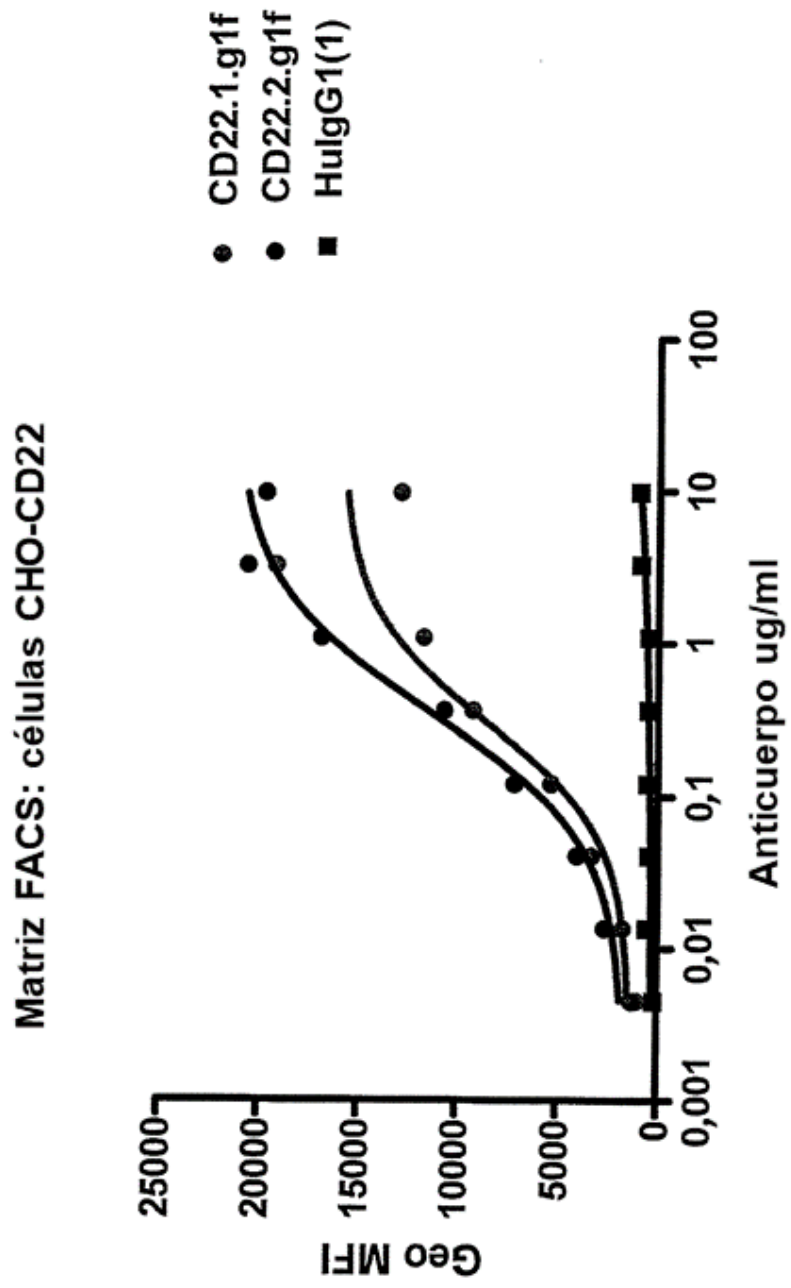


Figura 14

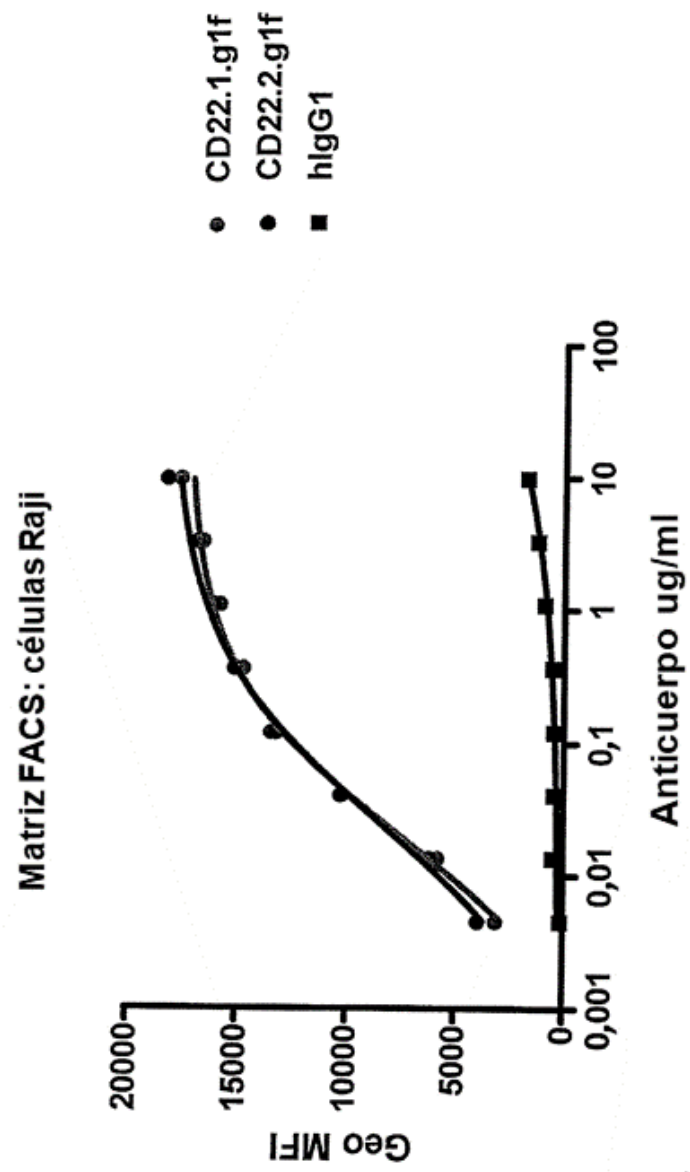


Figura 15

Unión a CD22 d1d2-mFc
Formato ELISA indirecto

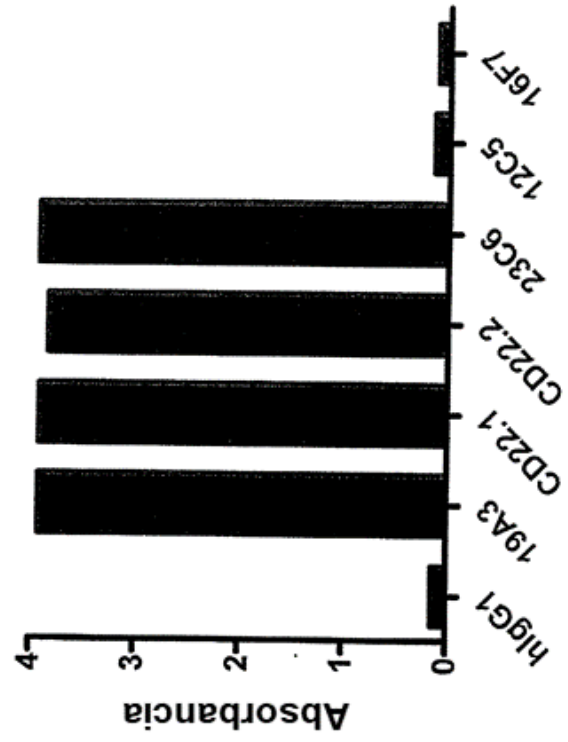
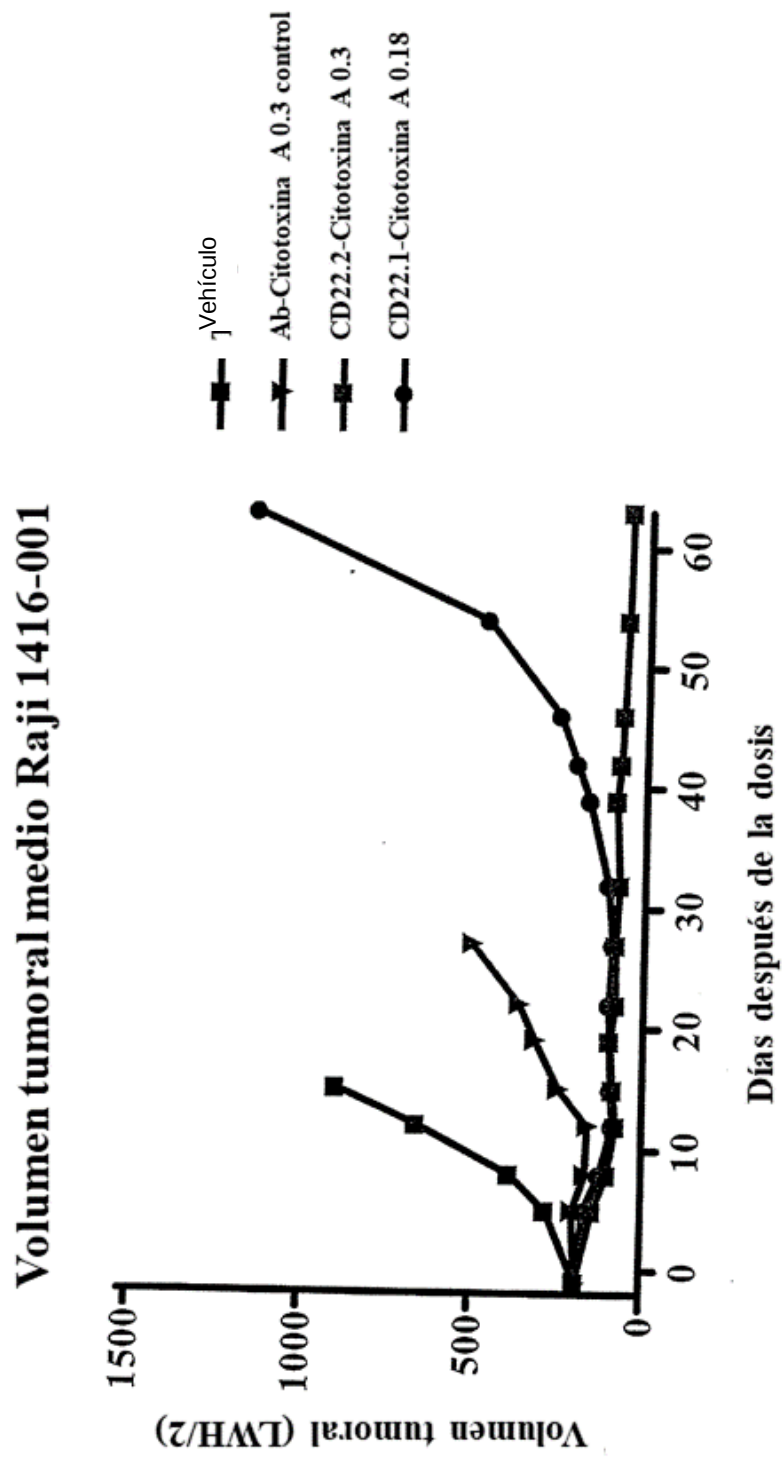


Figura 16



Anti-CD22 4G6 VH

segmento V: 1-69
segmento D: 7-27
segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V
1  CAG GTC CAG TTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
      K  V  S  C  K  P  S  G  D  T  F  S  N  Y  A  I  S  W
55 AAG GTC TCC TGC AAG CCT TCT GGA GAC ACC TTC AGC AAC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
      V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  R  I  I  P  I
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA AGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                -----
      L  G  M  A  I  Y  A  P  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A
163 CTT GGT ATG GCT ATC TAC GCA CCG AAG TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATT ACC GCG

      D  K  S  T  N  T  A  F  M  D  L  T  S  L  Y  F  E  D
217 GAC AAA TCC ACG AAC ACA GCC TTC ATG GAT CTT ACC AGC CTG TAT TTT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T  A  V  Y  Y  C  A  R  A  P  T  Y  W  G  S  K  D  Y
271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GCC CCA ACT TAC TGG GGA TCG AAG GAC TAC

                                CDR3
                                -----
      F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 17A

Anti-CD22 4G6 VK1

segmento V: L18
segmento J: JK2

```

      A  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
1  GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                        CDR1
      V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  S  S  G  L  A  W  Y
55 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AGT GGT TTA GCC TGG TAT

                        CDR2
      Q  Q  K  P  G  T  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L
109 CAG CAG AAA CCA GGG ACA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                        CDR3
      L  T  I  S  S  L  Q  P  D  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAC GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      F  N  S  F  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K
271 TTT AAT AGT TTC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 17B

Anti-CD22 4G6 VK2

segmento V: A27
segmento J: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      -----
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
      -----
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      -----
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
      -----
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      -----
      Q   Y   G   S   S   P   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 17C

Anti-CD22 21F6 VH1

segmento V: 4-34
segmento D: 3-9
segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L
1  CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
      S  L  T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  G  H  Y  W  S  W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT CAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
      I  R  Q  S  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  T  D  H  S
109 ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ACC GAT CAT AGT

                                CDR2
                                -----
      G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  I  D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA ATA GAC

      T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T
217 ACG TCC AAG AAT CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
      A  V  Y  Y  C  A  R  T  Y  Y  D  I  L  T  D  Y  Y  P
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG ACG TAT TAC GAT ATT TTG ACT GAT TAT TAC CCC

                                CDR3
                                -----
      F  D  S  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325 TTT GAC TCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 18A

Anti-CD22 21F6 VH2

segmento V: 4-34
segmento D: 3-9
segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L
1  CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
      S  L  T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  G  H  Y  W  S  W
55  TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT CAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
      I  R  Q  S  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  D  H  S
109 ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CAT AGT

                                CDR2
                                -----
      G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
      A  M  Y  Y  C  A  R  T  Y  Y  D  I  L  T  D  Y  Y  P
271 GCT ATG TAT TAC TGT GCG AGG ACG TAT TAC GAT ATT TTG ACT GAT TAT TAC CCC

                                CDR3
                                -----
      F  D  S  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325 TTT GAC TCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 18B

Anti-CD22 21F6 VK

segmento V: L6
segmento J: JK4

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S G Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC GGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D V S Y R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GTA TCC TAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I L V R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CTA GTC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P I T F G G G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCC ATC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 18C

Anti-CD22 4G6 VH	
segmento V:	1-69
segmento D:	7-27
segmento J:	JH4b

1-69 lín. germinal	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
4G6 VH	- - - - - CDR1 - - - - - P - - - - - N - - - - -

1-69 lín. germinal	V R Q A P G Q G L E W M G R I I P I L G I A N Y A Q K F Q G R V T I T A
4G6 VH	- - - - - CDR2 - - - - - M - I - - - - -

1-69 lín. germinal	D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
JH4b lín. germinal	- - - - - CDR3 - - - - - Y
4G6 VH	- - - - - F - D - T - - - - - Y F - - - - - A P T Y W G S K D -

JH4b lín. germinal	F D Y W G Q G T L V T V S S
4G6 VH	- - - - -

FIGURA 19A

Anti-CD22 4G6 VK1

segmento V:	L18
segmento J:	JK2

[illegible]

FIGURA 19B

Anti-CD22 4G6 VK2

segmento V: A27
segmento J: JK4

A27 lin. germinal	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
4G6 VK2	- - - - -
A27 lin. germinal	A T L S C <u>CDR1</u> R A S Q S V S S S Y L A W
4G6 VK2	- - - - -
A27 lin. germinal	Y Q Q K P G Q A P R L L I Y <u>CDR2</u> G A S S
4G6 VK2	- - - - -
A27 lin. germinal	<u>CDR3</u> R A T G I P D R F S G S G S G T D F
4G6 VK2	- - - - -
A27 lin. germinal	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
4G6 VK2	- - - - -
A27 lin. germinal	<u>CDR3</u> Q Y G S S P
JK4 lin. germinal	T F G G G T K V E I K
4G6 VK2	- - - - -

FIGURA 19C

Anti-CD22 21F6 VH1

4-34 lin. germinal	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
21F6 VH1	- - - - -
4-34 lin. germinal	S L T C A V Y G G S F S <u>CDR1</u> G Y Y W S W
21F6 VH1	- - - - - H - - - -
4-34 lin. germinal	I R Q P P G K G L E W I G <u>CDR2</u> E I N H S
21F6 VH1	- - - S - - - - - T D - -
4-34 lin. germinal	<u>CDR2</u> G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
21F6 VH1	- - - - - I -
4-34 lin. germinal	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
21F6 VH1	- - - - -
4-34 lin. germinal	A V Y Y C A R <u>CDR3</u>
21F6 VH1	- - - - - T Y Y D I L T D Y Y P
JH4b lin. germinal	<u>F D Y</u> W G Q G T L V T V S S
21F6 VH1	- - S - - - - -

FIGURA 20A

Anti-CD22 21F6 VH2

4-34 lín. germinal	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
21F6 VH2	- - - - - - - - - - - - - - - -

4-34 lín. germinal	S L T C A V Y G G S F S <u>CDR1</u> G Y Y W S W
21F6 VH2	- - - - - - - - - - - - H - - - -

4-34 lín. germinal	I R Q P P G K G L E W I G <u>CDR2</u> E I N H S
21F6 VH2	- - - S - - - - - - - - - - D - -

4-34 lín. germinal	<u>CDR2</u> G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
21F6 VH2	- - - - - - - - - - - - - - - -

4-34 lín. germinal	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
21F6 VH2	- - - - - - - - - - - - - - - -

4-34 lín. germinal	A V Y Y C A R <u>CDR3</u>
21F6 VH2	- M - - - - - T Y Y D I L T D Y Y P

JH4b lín. germinal	<u>FDY</u> W G Q G T L V T V S S
21F6 VH2	- - S - - - - - - - - - -

FIGURA 20B

Anti-CD22 21F6 VK

L6 lin. germinal 21F6 VK1	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	CDR1
	- - - - -	- - - - -
L6 lin. germinal 21F6 VK1	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	CDR2
	- - - - -	- - - - -
L6 lin. germinal 21F6 VK1	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N	CDR3
	- - - - -	- - - - -
L6 lin. germinal JK4 lin. germinal 21F6 VK1	W P T F G G G T K V E I K	
	- - I - - - - -	- - - - -

FIGURA 20C

Figura 21

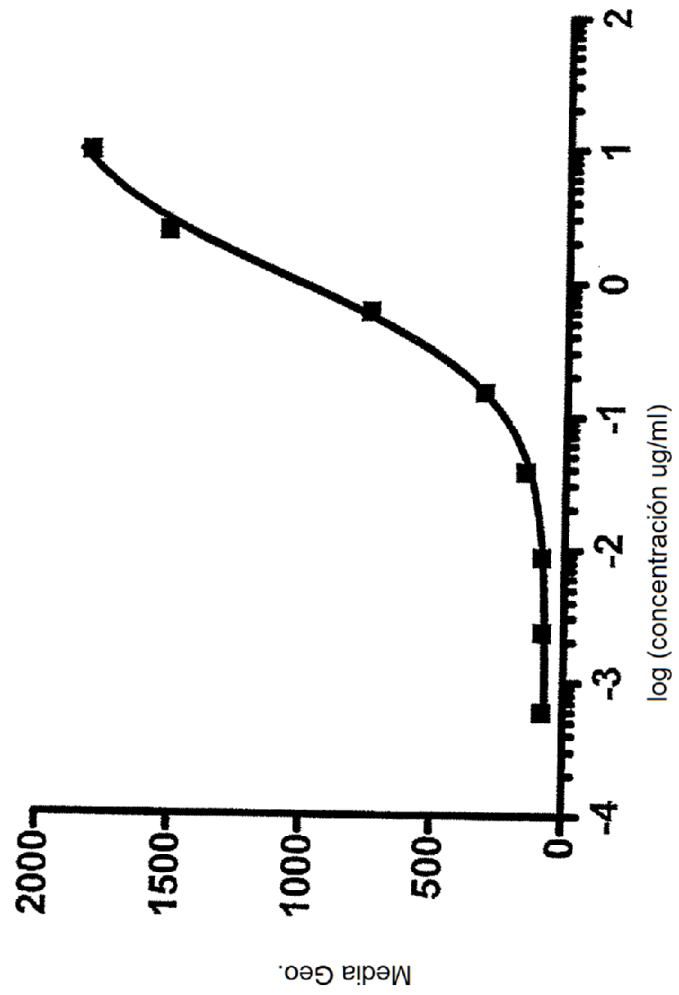


Figura 22

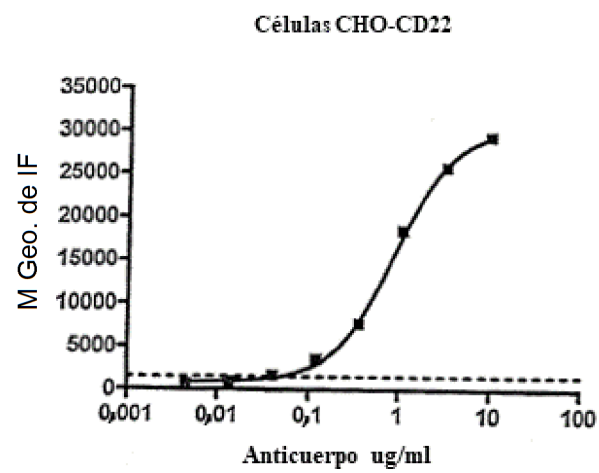


Figura 23

