

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 618**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 31/551** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2013 PCT/US2013/041209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013 E 13790467 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2850104**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD33 y uso de los mismos para tratar cáncer**

30 Prioridad:

**18.05.2012 US 201261649110 P**

**14.03.2013 US 201313804227**

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

**18.10.2018**

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)**

**21823 30th Drive, S.E.**

**Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**SUTHERLAND, MAY KUNG;**

**RYAN, MAUREEN;**

**SUSSMAN, DJANGO;**

**BURKE, PATRICK y**

**JEFFREY, SCOTT**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 686 618 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-CD33 y uso de los mismos para tratar cáncer

**Antecedentes**

5 CD33 es una proteína de membrana plasmática de 67 kDa que se une al ácido siálico y es un miembro de la familia de proteínas de lectina relacionada con Ig de unión a ácido siálico (SIGLEC). Se sabe que CD33 se expresa en células mieloides. También se ha informado de la expresión de CD33 en varias células malignas. Aunque CD33 se ha seleccionado para el tratamiento del cáncer, p.ej., leucemia mieloide aguda, actualmente no hay en el mercado tratamientos dirigidos a CD33 eficaces. La presente invención resuelve estos y otros problemas.

10 El documento WO 2004/043344 describe un anticuerpo que se une a CD33 distinto del de la presente solicitud y un producto conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo. Se informó de que el producto conjugado de anticuerpo y fármaco era eficaz solo a altas dosis.

**Compendio de la invención reivindicada**

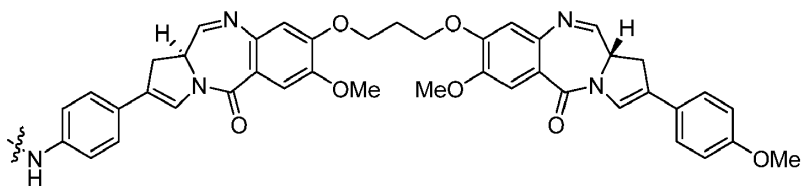
15 Se proporcionan en la presente memoria anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la proteína CD33 humana y métodos para la utilización de esos anticuerpos para el tratamiento de cánceres que expresan la proteína CD33. Los anticuerpos monoclonales contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) de SEQ ID NO: 19, 20 y 21 en la región variable de cadena pesada y CDR de SEQ ID NO: 22, 23 y 24 en la región variable de cadena ligera. En algunas realizaciones, al menos una CDR tiene una sustitución de aminoácidos conservada. En algunas realizaciones, cualquier diferencia en las CDR de la región variable de la cadena pesada madura y la región variable ligera madura de SEQ ID NO: 18 y 8 residen, respectivamente, en las posiciones H60-20 H65. Los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos murinos, anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados. Un anticuerpo humanizado preferido es el anticuerpo h2H12, como se describe en la presente memoria.

25 En un aspecto, la invención es un anticuerpo humanizado que incluye las CDR de SEQ ID NO: 19, 20 y 21 en la región variable de cadena pesada y las CDR de SEQ ID NO: 22, 23 y 24 en la región variable de cadena ligera y adicionalmente tiene una región variable de cadena pesada madura con al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 18 y una región de cadena ligera madura con al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 8. Además, se mantienen los siguientes restos de aminoácidos de la cadena pesada: H48 está ocupada por I, la posición H66 está ocupada por K, la posición H67 está ocupada por A, la posición H69 está ocupada por L, la posición H71 está ocupada por A, y la posición H94 está ocupada por S; y se mantienen los siguientes restos de aminoácidos de la cadena ligera: L22 30 está ocupado por N, la posición L46 está ocupada por T, la posición L69 está ocupada por Q y la posición L71 por Y. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado incluye las CDR de SEQ ID NO: 19, 20 y 21 en la región variable de cadena pesada y las CDR de SEQ ID NO: 22, 23 y 24 en la región variable de cadena ligera y adicionalmente tiene una región variable de cadena pesada madura con al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 18 y una región de cadena ligera madura con al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 8.

35 En otra realización, el anticuerpo 2H12 humanizado tiene una cadena pesada madura que está fusionada a una región constante de la cadena pesada y una cadena ligera madura que está fusionada a una región constante de la cadena ligera. En una realización adicional, la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural y presenta una reducción de la unión a un receptor para Fcγ con respecto a la región constante humana natural. En otra realización, la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1. 40 Las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada ilustrativas incluyen SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 29, una región constante de la cadena pesada con serina que sustituye la cisteína en la posición 239, (S239C). Las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera ilustrativas incluyen SEQ ID NO: 25.

45 En una realización, el anticuerpo humanizado incluye una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

50 En una realización, el anticuerpo humanizado se conjuga con un agente citotóxico o citostático. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado se conjuga con un agente citotóxico. Un agente citotóxico puede ser, p.ej., un ligando de fijación al surco menor de ADN. Una pirrolo[1,4]benzodiazepina (PBD) es un ejemplo de un agente citotóxico que es un ligando de fijación al surco menor del ADN que se puede conjugar con los anticuerpos contra CD33 humanizados descritos en la presente memoria. En una realización, la PBD se conjuga con el anticuerpo contra CD33 a través de un conector escindible por enzimas. En otra realización, el agente citotóxico tiene la fórmula



en donde la línea ondulada indica el sitio de anclaje al conector.

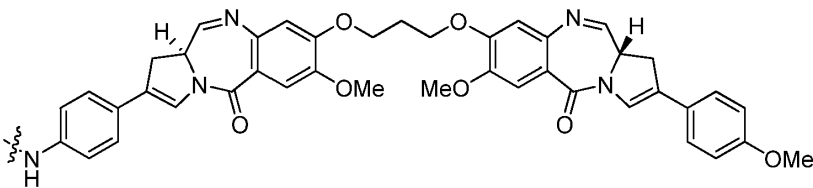
En una realización, el anticuerpo humanizado tiene una constante de asociación para CD33 humana o de mono cinomolgo de  $0,5$  a  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a CD33 como se describe en la presente memoria, para su uso en métodos de tratamiento de un paciente que tiene o está en riesgo de tener un cáncer que expresa CD33, administrando al paciente un régimen eficaz de un anticuerpo humanizado contra CD33 como se describe en la presente memoria. Los cánceres que expresan CD33 incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), un trastorno mieloproliferativo crónico, leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (LLA-preB), leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras (LLA-preT), mieloma múltiple (MM), enfermedad de mastocitos y sarcoma mieloide. En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado o quimérico que contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de SEQ ID NO: 19, 20 y 21 en la región variable de cadena pesada y CDR de SEQ ID NO: 22, 23 y 24 en la región variable de cadena ligera.

En una realización adicional, el anticuerpo humanizado tiene CDR de la región variable de cadena pesada madura que son idénticas a las de SEQ ID NO: 18 y CDR de la región variable de cadena ligera madura que son idénticas a las de SEQ ID NO: 8.

- 20 En una realización, el anticuerpo humanizado incluye una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

- En una realización, el anticuerpo humanizado se conjuga con un agente citotóxico o citostático. En una realización, el anticuerpo humanizado se conjuga con un agente citotóxico o citostático. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado se conjuga con un agente citotóxico. Un agente citotóxico puede ser, p.ej., un ligando de fijación al surco menor de ADN. Una pirrolo[1,4]benzodiazepina (PBD) es un ejemplo de un agente citotóxico que es un ligando de fijación al surco menor de ADN que se puede conjugar con los anticuerpos contra CD33 humanizados descritos en la presente memoria. En una realización, la PBD se conjuga con el anticuerpo contra CD33 a través de un conector escindible por enzimas. En otra realización, el agente citotóxico tiene la fórmula



- 30 en donde la línea ondulada indica el sitio de unión al conector.

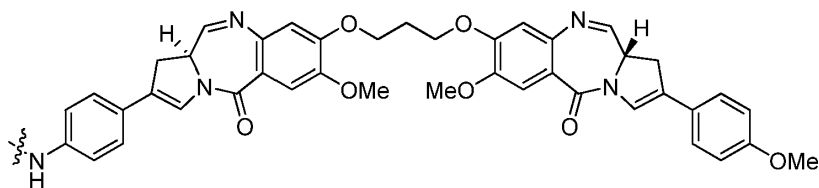
En otra realización, el anticuerpo humanizado tiene una constante de asociación para CD33 humana o de mono cinomolgo de  $0,5$  a  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

- En otra realización, el anticuerpo humanizado tiene una cadena pesada madura que está fusionada a una región constante de la cadena pesada y una cadena ligera madura que está fusionada a una región constante de la cadena ligera. En una realización adicional, la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural y presenta una reducción de la unión a un receptor Fcγ con respecto a la región constante humana natural. En otra realización, la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1. Las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada ilustrativas incluyen SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 29 (S239C). Las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera ilustrativas incluyen SEQ ID NO: 25.

- En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica cualquiera de las regiones variables de cadena pesada o ligera maduras descritas en la presente memoria. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican regiones variables de cadena pesada incluyen SEQ ID NO: 39-47; los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican regiones variables de cadena ligera incluyen SEQ ID NO: 32-38.

- 45 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de tener un

cáncer que expresa CD33, administrando al paciente un régimen eficaz de un anticuerpo humanizado contra CD33 como se describe en la presente memoria. Los cánceres que expresan CD33 incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), trastornos mieloproliferativos crónicos, leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (LLA-preB), leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras (LLA-preT), mieloma múltiple (MM), enfermedad de mastocitos y sarcoma mieloide. Los anticuerpos humanizados se administran preferiblemente en una composición farmacéuticamente adecuada. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado administrado se conjuga con un agente citotóxico o citostático. En una realización, el anticuerpo humanizado administrado se conjuga con un agente citotóxico o citostático. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado administrado se conjuga con un agente citotóxico. Un agente citotóxico puede ser, por ejemplo, un ligando de fijación al surco menor de ADN. Una pirrolo[1,4]benzodiazepina (PBD) es un ejemplo de un agente citotóxico que es un ligando de fijación al surco menor de ADN que se puede conjugar con los anticuerpos contra CD33 humanizados administrados descritos en la presente memoria. En una realización, la PBD se conjuga con el anticuerpo contra CD33 administrado a través de un conector escindible por enzimas. En otra realización, el agente citotóxico tiene la fórmula



en donde la línea ondulada indica el sitio de anclaje al conector.

#### Breve descripción de las figuras

Las **Figuras 1A y 1B** muestran un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del mAb murino parental (denominado m2H12) con las regiones variables de cadena pesada de 2H12 humanizado (**Figura 1A**) y de cadena ligera (**Figura 1B**).

La **Figura 2** muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad in vitro que analiza la actividad de los productos conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) derivados de 2H12 contra las líneas celulares de LMA positivas para CD33 HL-60 y HEL 92.1.7. Se conjugó h2H12d con SGD-1910; se conjugaron m2H12 y h2H12 con SGD-1269. Se sometieron a prueba ADC de control que no presentaban unión (h00d-SGD-1910 y h00-SGD-1269) como un control de la especificidad de antígeno. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina) es un producto conjugado de fármaco - anticuerpo dirigido a CD33 bien descrito que comprende un anticuerpo anti-CD33 hP67.6 unido al fármaco citotóxico caliqueamicina y también se sometió a prueba.

#### Definiciones

La invención proporciona, *entre otros*, anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la proteína CD33 humana y productos conjugados de los mismos. Los anticuerpos son útiles para el tratamiento y diagnóstico de cánceres que expresan CD33, así como para detectar la proteína CD33.

Un anticuerpo "aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de componentes de su entorno natural y/o un anticuerpo que se produce de forma recombinante. Un "anticuerpo purificado" es un anticuerpo que tiene una pureza típicamente de al menos 50% p/p de proteínas que interfieren y otros contaminantes que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de portadores farmacéuticamente aceptables u otro vehículo destinado a facilitar su uso. Las proteínas que interfieren y otros contaminantes pueden incluir, por ejemplo, componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla un anticuerpo o se produce de forma recombinante. A veces, los anticuerpos monoclonales tienen una pureza de al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95 o 99% p/p de proteínas que interfieren y contaminantes procedentes de la producción o purificación. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, que incluyen anticuerpos murinos, quiméricos y humanizados, se pueden proporcionar en forma aislada y/o purificada.

El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4816567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas por Clackson et al. (1991) en Nature, 352:624-628 y Marks et

al. (1991) en *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, por ejemplo, o se pueden elaborar mediante otros métodos. Los anticuerpos descritos en la presente memoria son anticuerpos monoclonales.

5 La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno diana significa una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}$   $M^{-1}$ . La unión específica tiene una magnitud detectablemente más alta y es distinguible de la unión no específica que se produce para al menos una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o un ajuste espacial particular (p.ej., de tipo cerradura y llave), mientras que la unión no específica es generalmente el resultado de las fuerzas de van der Waals.

10 La unidad estructural básica de los anticuerpos es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente unida a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal a veces se denomina región variable madura. Por lo tanto, por ejemplo, una región variable madura de cadena ligera, significa una región variable de cadena ligera sin el péptido señal de cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

15 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase generalmente, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y., 1989, Capítulo 7).

20 Las regiones variables maduras de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, las cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Secuencias of Proteins of Immunological Interest* (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los restos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número.

35 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos de anticuerpos compiten con el anticuerpo intacto del que derivaron por la unión específica a la diana que incluye cadenas pesadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, diacuerpos, Dab, nanocuerpos y Fv separados. Los fragmentos se pueden producir por medio de técnicas de ADN recombinante o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye un diacuerpo (fragmento Fv homodimérico) o un minicuerpo (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3) o un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes (véase, p.ej., Songvilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)).

El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo en sí mismo (anticuerpo desnudo) o un anticuerpo conjugado a un fármaco citotóxico o citostático.

45 El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Se puede formar un epítipo a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente al exponerlos a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p.ej., *Epitope Mapping Protocols*, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

55 Los anticuerpos que reconocen los mismos epítipos solapantes se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir por la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. El epítipo de un anticuerpo también se puede definir mediante cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar los restos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos solapantes si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o

5 eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo en prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (véase, p.ej., Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Un anticuerpo de prueba compete con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de prueba (p.ej., al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos en 50% pero preferentemente en 75%, 90% o 99% medido en un ensayo de unión competitiva. Los anticuerpos identificados por medio del ensayo competitivo (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo al que se ha unido el anticuerpo de referencia para que se produzca el impedimento estérico. Los anticuerpos que compiten con el anticuerpo h2H12 por la unión a la proteína CD33 humana se incluyen en esta descripción.

10 Un anticuerpo 2H12 es un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD33 humana, y que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (hCDR): CDR1 de cadena pesada, p.ej., SEQ ID NO: 19 o una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 19, CDR2 de cadena pesada, p.ej., SEQ ID NO: 20 o una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 20, y CDR3 de cadena pesada, p.ej., SEQ ID NO: 21 o una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 21; y tres CDR de cadena ligera: CDR1 de cadena ligera, p.ej., SEQ ID NO: 22 o una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 22, CDR2 de cadena ligera, p.ej., SEQ ID NO: 23 o una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 23, y CDR3 de cadena ligera, p.ej., SEQ ID NO: 24 o una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 24. Los anticuerpos 2H12 incluyen el anticuerpo murino 2H12 (m2H12) y anticuerpos quiméricos o humanizados derivados del anticuerpo 2H12 murino.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

25 Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales alcalinas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

30 Los porcentajes de identidad de la secuencia se determinan con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo mediante la convención de numeración de Kabat. Después del alineamiento, si se compara una región de anticuerpo sujeto (p.ej., la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones sujeto y del anticuerpo de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región sujeto como en la región del anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los huecos, multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

35 Las composiciones o métodos que comprenden "uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos que no se enumeran específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o combinado con otros ingredientes.

40 La designación de un intervalo de valores incluye todos los números enteros que están dentro o que definen el intervalo.

45 Una función efectora de anticuerpo se refiere a una función aportada por uno o varios dominios Fc de una Ig. Tales funciones pueden ser, por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo o la citotoxicidad dependiente del complemento. Tal función se puede efectuar, por ejemplo, uniendo uno o varios dominios efectoras de Fc a un receptor para Fc en una célula inmunitaria con actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de uno o varios dominios efectoras de Fc a componentes del sistema del complemento. Típicamente, el efecto o los efectos mediados por las células de unión a Fc o los componentes del complemento dan como resultado la inhibición y/o el agotamiento de la célula con CD33 elegida como diana. Las regiones Fc de los anticuerpos pueden reclutar células que expresan el receptor para Fc (FcR) y yuxtaponerlas con células diana recubiertas de anticuerpo. Las células que expresan FcR en la superficie para las IgG, incluyendo FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRI (CD64) pueden actuar como células efectoras para la destrucción de células recubiertas con IgG. Tales células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos. La interacción de FcγR con IgG activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). La ADCC está mediada por células efectoras CD16<sup>+</sup> a través de la secreción de proteínas y proteasas que forman poros de la membrana, mientras que la fagocitosis está mediada por células efectoras CD32<sup>+</sup> y CD64<sup>+</sup> (véase Fundamental Immunology, 4<sup>a</sup> ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Capítulos 3, 17 y 30; Uchida et al., 2004, J. Exp. Med. 199: 1659-69; Akewanlop et al., 2001, Cancer Res. 61:4061-65; Watanabe et al., 1999, Breast Cancer Res. Treat. 53:199-207). Además de ADCC y ADCP, las regiones Fc de los anticuerpos unidos a las células también pueden activar la vía clásica del complemento para provocar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). C1q del sistema del complemento se une a las regiones Fc de anticuerpos cuando están complejados con antígenos. La unión de C1q a anticuerpos

unidos a células puede iniciar una cascada de eventos que implican la activación proteolítica de C4 y C2 para generar la convertasa C3. La escisión de C3 a C3b por la convertasa C3 permite la activación de componentes terminales del complemento, incluidos C5b, C6, C7, C8 y C9. En conjunto, estas proteínas forman poros complejos de ataque a la membrana sobre las células recubiertas de anticuerpos. Estos poros interrumpen la integridad de la membrana celular, destruyendo la célula diana (véase Immunobiology, 6ª ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, Capítulo 2).

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo", o ADCC, es un mecanismo para inducir la muerte celular que depende de la interacción de las células diana recubiertas de anticuerpo con células inmunitarias que poseen actividad lítica (también denominadas células efectoras). Tales células efectoras incluyen células asesinas naturales, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Las células efectoras se anclan a uno o varios dominios efectoros para Fc de Ig unidos a las células diana a través de sus sitios de combinación con antígenos. La muerte de la célula diana recubierta con anticuerpos se produce como resultado de la actividad de la célula efectora.

El término "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos", o ADCP, se refiere al proceso por el cual las células recubiertas de anticuerpos son internalizadas, en parte o en su totalidad, por células inmunitarias fagocíticas (p.ej., macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) que se unen a uno o varios dominios efectoros para Fc de Ig.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento", o CDC, se refiere a un mecanismo para inducir la muerte celular en el que un dominio efector para Fc de un anticuerpo unido a la diana activa una serie de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de orificios en la membrana de la célula diana. Típicamente, los complejos antígeno-anticuerpo tales como los de las células diana recubiertas de anticuerpo se unen y activan el componente del complemento C1q, que a su vez activa la cascada del complemento que conduce a la muerte de la célula diana. La activación del complemento también puede dar como resultado el depósito de componentes del complemento sobre la superficie de la célula diana que facilitan la ADCC al unirse a los receptores del complemento (p.ej., CR3) sobre los leucocitos.

Un "efecto citotóxico" se refiere al agotamiento, la eliminación y/o la destrucción de una célula diana. Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico sobre una célula.

Los agentes citotóxicos se pueden conjugar con un anticuerpo o se pueden administrar combinados con un anticuerpo.

Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" se refiere a un agente que tiene un efecto citostático sobre una célula, inhibiendo de ese modo el crecimiento y/o la expansión de un subconjunto específico de células. Los agentes citostáticos se pueden conjugar con un anticuerpo o se pueden administrar combinados con un anticuerpo.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra un anticuerpo anti-CD33 a un sujeto.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un anticuerpo anti-CD33-1 o un producto conjugado del mismo o agente administrado con un anticuerpo anti-CD33-1. Las sales ilustrativas incluyen sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2'-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier radical orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

A menos que resulte evidente por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de una desviación típica de un valor establecido.

## Descripción detallada

### I. General

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CD33. Los anticuerpos son útiles para el tratamiento y diagnóstico de varios cánceres, así como para detectar CD33.

## II. Moléculas diana

A menos que se indique lo contrario, CD33 significa una CD33 humana. A una secuencia humana ilustrativa se le asigna el número de acceso de Swiss Prot P20138. P20138 está incluido en la presente memoria como SEQ ID NO: 55. P20138 incluye un péptido señal, aminoácidos 1-17; un dominio extracelular con dominios de tipo IgG, aminoácidos 18-259; un dominio transmembrana, aminoácidos 260-282; y un dominio citoplásmico, aminoácidos 283-364.

A menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto, la referencia a CD33 significa al menos un dominio extracelular de la proteína y habitualmente la proteína completa distinta de un péptido señal escindible (aminoácidos 1-17 de P20138).

## III. Anticuerpos de la invención

## A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

La invención proporciona un anticuerpo murino, m2H12, y anticuerpos quiméricos o humanizados derivados de m2H12. Los anticuerpos murinos se seleccionaron por la capacidad de unirse tanto a la proteína CD33 humana como a la proteína CD33 de cinomolgo. Las secuencias de aminoácidos de CD33 de cinomolgo se proporcionan como SEQ ID NO: 56 y 57.

La afinidad de las formas humanizadas o quiméricas del anticuerpo m2H12 murino (es decir,  $K_a$ ) puede ser mayor que la del anticuerpo m2H12, o dentro de un factor de cinco o un factor de dos (es decir, mayor o menor que) la de ese del anticuerpo murino m2H12 para CD33 humana. Un método para medir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno diana es mediante la determinación de la constante de disociación aparente de un anticuerpo. La presente invención abarca anticuerpos (p.ej., formas quiméricas y humanizadas del anticuerpo 2H12 de ratón) que tienen una constante de disociación aparente que es esencialmente la misma que la del 2H12 murino (es decir, dentro del error experimental) así como anticuerpos que tienen una constante de disociación menor o mayor que la del anticuerpo 2H12 murino para CD33 humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención (p.ej., formas quiméricas, humanizadas y humanas del anticuerpo 2H12 de ratón) tienen una constante de disociación aparente dentro de un intervalo de 0,1 a 10 veces, o preferiblemente dentro de un intervalo de 0,1 a 5 veces, 0,1 a 2 veces, o incluso a 0,5 a 2 veces la de la constante de disociación aparente del anticuerpo 2H12 murino para CD33 humana. En algunos aspectos, la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) de los anticuerpos contra CD33 humana está preferiblemente dentro de un intervalo de 0,1 nM a 50 nM, incluso más preferiblemente dentro de un intervalo de 0,1 nM a 25 nM, incluso preferiblemente dentro de un intervalo de 0,1 nM a 10 nM, de 0,5 nM a 5 nM, o de 0,5 nM a 2,5 nM. Los anticuerpos m2H12 humanizados o quiméricos se unen específicamente a CD33 humana en forma nativa y/o se expresan de forma recombinante a partir de células CHO como lo hace el anticuerpo m2H12 murino del que se obtuvieron. Los anticuerpos m2H12 humanizados o quiméricos se unen al mismo epítipo y/o compiten con m2H12 por la unión a CD33 humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos m2H12 humanizados o quiméricos también se unen a CD33 de cinomolgo, permitiendo de este modo el ensayo preclínico en primates no humanos.

Los anticuerpos preferidos (p.ej., anticuerpos m2H12 humanizados o quiméricos) inhiben el cáncer (p.ej., crecimiento de células, metástasis y/o letalidad para los organismos) como se muestra en células cancerosas que se propagan en cultivo, en un modelo animal o en una prueba clínica. Se pueden formar modelos animales implantando líneas celulares tumorales humanas que expresan CD33 o células tumorales primarias de pacientes en cepas de roedores inmunodeficientes apropiadas, p.ej., ratones inmunodeprimidos atímicos, NSG, o ratones SCID. Estas líneas celulares tumorales pueden establecerse en anfitriones roedores inmunodeficientes, ya sea como tumor sólido mediante inyecciones subcutáneas o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez establecidos dentro de un anfitrión, estos modelos tumorales se pueden aplicar para evaluar las eficacias terapéuticas de los anticuerpos anti-CD33 o formas conjugadas de los mismos como se describe en los Ejemplos.

## B. Anticuerpos

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado genéticamente en el que las CDR de un anticuerpo "donador" no humano se injertan en secuencias de anticuerpos "aceptores" humanos (véase, p.ej., Queen, documentos US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, documento US 5.225.539; Carter, documento US 6.407.213; Adair, US 5.859.205; y Foote, documento US 6.881.557). Las secuencias de anticuerpos aceptores pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano maduro, un material compuesto de tales secuencias, una secuencia consenso de secuencias de anticuerpos humanos, o una secuencia de la región de la línea germinal. Una secuencia aceptora preferida para la cadena pesada es el exón de  $V_H$  de la línea germinal  $V_H1-18$  y para el exón J ( $J_H$ ), el exón  $J_H-6$ . Para la cadena ligera, una secuencia aceptora preferida es el exón de  $V_L$  de  $V_L1-16$ , y para exón J ( $J_L$ ), el exón  $J_L-4$ . Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene algunas o todas las CDR completamente o sustancialmente de un anticuerpo donador no humano y secuencias marco de región variable y regiones constantes, si están presentes, completamente o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. De manera similar, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, dos y habitualmente las tres CDR completamente o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donador, y una secuencia marco de región variable de cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, si está presente, sustancialmente del marco de la región



variable de cadena pesada humana y secuencias de la región constante. De manera similar, una cadena ligera humanizada tiene al menos una, dos y habitualmente las tres CDR completamente o sustancialmente de una cadena ligera de anticuerpo donador, y una secuencia marco de región variable de cadena ligera variable y una región constante de la cadena ligera, si está presente, sustancialmente del marco de la región variable de la cadena ligera humana y secuencias de la región constante. Aparte de los nanoanticuerpos y dAb, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado o humano es sustancialmente de, o sustancialmente idéntica a, una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos 60%, 85%, 90%, 95% o 100% de los restos correspondientes (tal como define Kabat) son idénticos entre las respectivas CDR. En algunas realizaciones, una CDR en un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano es sustancialmente de, o sustancialmente idéntica a, una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando no hay más de 3 sustituciones conservativas de aminoácidos en cada CDR. Las secuencias marco de la región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia marco de región variable humana o región constante humana, respectivamente cuando al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de los restos correspondientes definidos por Kabat son idénticos. En algunos anticuerpos humanizados de la presente invención, existe al menos una retromutación de 2H12 murino en la región marco variable de la cadena pesada del anticuerpo. Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (preferiblemente como define Kabat) de un anticuerpo de ratón, también se pueden preparar con menos CDR (p.ej., al menos 3, 4 o 5) CDR de un anticuerpo de ratón (p.ej., Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

Ciertos aminoácidos de los restos del marco de la región variable humana se pueden seleccionar para su sustitución en función de su posible influencia sobre la conformación de las CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias es mediante el modelado, el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto del marco de la región variable murina y un resto del marco de la región variable humana seleccionado, el aminoácido del marco humano se puede sustituir por el aminoácido del marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) no se una covalentemente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) de lo contrario, interactúe con una región CDR (p.ej., está a aproximadamente 6 Å de una región CDR); o
- (4) medie la interacción entre las cadenas pesada y ligera.

La invención proporciona formas humanizadas del anticuerpo m2H12 de ratón que incluyen nueve regiones variables maduras de cadena pesada humanizadas ilustrativas (HA-HI) y siete regiones variables maduras de cadena ligera humanizada ilustrativas (LA-LG). Las permutaciones de estas cadenas que tienen la unión más fuerte (CE50 más baja) son HCLA, HCLE, HCLG, HILA, HILE y HILG. De estas permutaciones, se prefiere HILG (también conocido como h2H12) porque tiene la unión más fuerte.

La invención proporciona anticuerpos 2H12 en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos 90% de identidad con HA (SEQ ID NO: 10) y una región variable de cadena ligera al menos 90% idéntica a LA (SEQ ID NO: 2). En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y existe al menos una retromutación de 2H12 murino en la región marco variable de la cadena pesada. En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y existe al menos una retromutación de 2H12 murino en la región marco variable de la cadena ligera. Adicionalmente, la invención proporciona anticuerpos 2H12 en los que la región variable de la cadena pesada humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NOS: 10-18 y la región variable de cadena ligera humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2-8 (y cualquier combinación de las mismas (es decir, el anticuerpo puede comprender cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera). Por ejemplo, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de cadena ligera humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NOS: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al

menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%. 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12 , 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12 , 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%. 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12 , 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, 11, 12 , 13, 14, 15, 16, 17 o 18, y la región variable de la cadena ligera muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8.

En algunos aspectos, estos anticuerpos son anticuerpos humanizados y se conservan algunas o todas las retromutaciones en los respectivos anticuerpos. En algunos anticuerpos, la posición H94 está ocupada por S. En algunos anticuerpos, preferiblemente, al menos una de las posiciones H48, H66, H67, H69, H71 y H94 está ocupada por el aminoácido de la posición correspondiente del anticuerpo 2H12 murino. Opcionalmente, en cualquier anticuerpo de este tipo, la posición H48 está ocupada por I; la posición H66 está ocupada por K; la posición H67 está ocupada por A; la posición H69 está ocupada por L; la posición H71 está ocupada por A; la posición H94 está ocupada por S. En otras realizaciones, en tales anticuerpos, preferiblemente, al menos una de las posiciones L22, L46, L69 y L71 está ocupada por el aminoácido de la posición correspondiente del anticuerpo 2H12 murino. Opcionalmente, en cualquier anticuerpo de este tipo, la posición L22 está ocupada por N; la posición L46 está ocupada por T; la posición L69 está ocupada por Q; y la posición L71 está ocupada por Y.

Preferiblemente, en cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, p.ej., anticuerpos humanizados 2H12 en los que la región variable de la cadena pesada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10-18 y la región variable de la cadena ligera muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2-8, las regiones CDR son idénticas o sustancialmente idénticas a las regiones CDR del anticuerpo donador de ratón, es decir, el anticuerpo murino 2H12 (SEQ ID NO: 19-24). Las regiones CDR son las definidas por Kabat. Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos HCLA, HCLE, HCLG, HILA, HILE y HILG.

La invención proporciona variantes del anticuerpo humanizado HILG en las que la región variable madura de la cadena pesada humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 18 y la región variable madura de la cadena ligera humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8. En algunos de tales anticuerpos, la posición H94 está ocupada por S. Preferiblemente, en tales anticuerpos se conservan algunas o todas las retromutaciones en HILG. En otras palabras, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o preferiblemente las 6 posiciones de la cadena pesada H48, H66, H67, H69, H71 y H94 están ocupadas por I y K y A y L y A y S, respectivamente. Asimismo, al menos 1, 2, 3 o preferiblemente las 4 posiciones de la cadena ligera L22, L46, L69 y L71 están ocupadas por N y T y Q e Y, respectivamente. Las regiones CDR de tales anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas a las regiones CDR de HILG, que son las mismas que las del anticuerpo donador de ratón. Las regiones CDR se pueden definir por cualquier definición convencional (p.ej., Chothia) pero son preferiblemente las definidas por Kabat. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR de SEQ ID NO: 18 y marcos de región variable con al menos 95% de identidad con los marcos de región variable de SEQ ID NO: 18. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR de SEQ ID NO: 8 y marcos de región variable con al menos 95% de identidad con los marcos de región variable de SEQ ID NO: 8. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR de SEQ ID NO: 18 y marcos de región variable con al menos 95% de identidad con los marcos de región variable de SEQ ID NO: 18, y una cadena ligera que comprende las tres CDR de SEQ ID NO: 8, y marcos de región variable con al menos 95% de identidad con los marcos de región variable de SEQ ID NO: 8.

En la medida en que los anticuerpos humanizados muestran cualquier variación del anticuerpo humanizado HILG ilustrado, una posibilidad para semejante variación adicional consiste en retromutaciones adicionales en los marcos de región variable. También se pueden elaborar cualquiera o todas las posiciones retromutadas en otras regiones variables maduras de cadena pesada o ligera humanizada ilustrada (es decir, 1, 2, 3, 4 o los 5 de H38 ocupada por N, H40 ocupada por R, H73 ocupada por K, H82A ocupada por S y H83 ocupada por T en la cadena pesada y 1 o ambas de L3 ocupadas por K, y L20 ocupada por I en la cadena ligera. Sin embargo, tales retromutaciones adicionales no son preferidas porque en general no mejoran la afinidad y la introducción de más restos de ratón puede aumentar el riesgo de inmunogenicidad.

Otra posible variación que describen los autores de la presente invención consiste en sustituir ciertos restos en las

CDR del anticuerpo de ratón por los restos correspondientes de las secuencias de CDR humanas, típicamente de las CDR de las secuenciasceptoras humanas utilizadas en el diseño de los anticuerpos humanizados ilustrados. En algunos anticuerpos solo se necesita una parte de las CDR, concretamente el subconjunto de restos de CDR requerido para la unión, denominado SDR, para conservar la unión en un anticuerpo humanizado. Los restos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en los SDR se pueden identificar basándose en estudios previos (por ejemplo, los restos H60-H65 de la CDR H2 a menudo no son necesarios), de las regiones CDR de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), mediante modelado molecular y/o empíricamente, o como describen Gonzales et al., en Mol. Immunol. 41:863 (2004). En tales anticuerpos humanizados en posiciones en las que uno o más restos de la CDR donadora están ausentes o en los que se omite una CDR donadora completa, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (mediante numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de tales sustituciones de aminoácidos del aceptor por los del donador en las CDR que se van a incluir, refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Tales sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y evitar preferiblemente reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y aminoácidos que se debe sustituir también se pueden seleccionar empíricamente.

Aunque no es preferible, se pueden realizar otras sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en restos del marco que no están en contacto con las CDR, o incluso algunos aminoácidos de restos en potencial contacto con las CDR dentro de las CDR. Con frecuencia, los reemplazos realizados en las secuencias humanizadas variantes son conservativos con respecto a los aminoácidos de HILG reemplazados en el caso de anticuerpos 2H12 humanizados. Preferiblemente, los reemplazos relativos a HILG (ya sean conservativos o no) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad o potencia de unión del mAb humanizado, es decir, su capacidad para unirse a CD33 humana e inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

Las variantes típicamente difieren de las secuencias de la región variable madura de la cadena pesada y ligera de HILG (h2H12) en un pequeño número (p.ej., típicamente no más de 1, 2, 3, 5 o 10 en la región variable madura de cadena ligera o cadena pesada, o ambas) de reemplazos, eliminaciones o inserciones.

Los autores de la presente invención también describen anticuerpos humanizados o quiméricos que tienen una CDR H2 con hasta 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones, deleciones o inserciones con respecto a CDR H2 de la cadena pesada HI y las CDR H1, H3, L1, L2 y L3, tienen cada una hasta 1, 2, 3 o 4 sustituciones, deleciones o inserciones con respecto a la CDR correspondiente de la cadena pesada HI o la cadena ligera LG. Los autores de la presente invención también describen anticuerpos humanizados o quiméricos que tienen una, o como máximo dos sustituciones de aminoácidos conservadas en los aminoácidos que se identifican como parte de una CDR. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos preferidas incluyen las siguientes. En CDR1 de la cadena ligera, un resto R se puede sustituir por K en la posición 24; G, S o T se pueden sustituir por A en la posición 25; M se puede sustituir por L en la posición 33; y T se puede sustituir por S en la posición 34. En CDR2 de la cadena ligera, un resto K se puede sustituir por un resto R en la posición 53; un resto M se puede sustituir por un resto L en la posición 54; un resto I se puede sustituir por un resto V en la posición 55; y un resto E se puede sustituir por un resto D en la posición 56. En CDR2 de la cadena pesada, un resto D se puede sustituir por un resto E en la posición 61; un resto R se puede sustituir por un resto K en la posición 62; un resto Y se puede sustituir por un resto F en la posición 63; un resto R se puede sustituir por un resto K en la posición 64; y un resto G se puede sustituir por un resto A en la posición 65.

Los autores de la presente invención también describen anticuerpos humanizados que comprenden una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 18, con una, dos o tres sustituciones conservativas en una secuencia de CDR como se menciona anteriormente. También describen anticuerpos humanizados que comprenden una región variable de la cadena ligera madura de SEQ ID NO: 8, con una dos o tres sustituciones conservativas en una secuencia de CDR como se menciona anteriormente.

#### A. Selección de la región constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados se pueden unir a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen una citotoxicidad fuerte dependiente del complemento, el isotipo IgG2 humano una citotoxicidad débil dependiente del complemento e IgG4 humana carece de citotoxicidad dependiente del complemento. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que las IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos se pueden expresar en forma de tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en forma de cadenas pesadas, cadenas ligeras separadas, en forma de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, o en forma de anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

Las regiones constantes humanas muestran variación alotípica y variación isoalotípica entre diferentes individuos, es

decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimorfas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimorfa de uno o más isotipos diferentes.

5 Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden estar ausentes o se pueden derivatizar en una proporción o en la totalidad de las moléculas. Se pueden realizar sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora tal como la citotoxicidad mediada por complemento o ADCC (véanse, p.ej., Winter et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.624.821; Tso et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.834.597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la semivida en seres humanos (véase, p.ej., Hinton et al., J. Biol. Chem. 10 279:6213, 2004).

15 La sustitución ilustrativa incluye la sustitución de aminoácidos del aminoácido nativo por un resto de cisteína introducido en la posición de aminoácido 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 o 332, preferiblemente una mutación S239C en un isotipo IgG1 humano (la numeración es de acuerdo con el índice EU (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1987 y 1991); véase el documento US 20100158909). La presencia de un resto de cisteína adicional permite la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas. Semejante formación de enlace disulfuro intercatenario puede causar un impedimento estérico, reduciendo de este modo la afinidad de la interacción de unión de la región Fc-FcγR. Los restos de cisteína introducidos en o cerca de la región Fc de una región constante de IgG también pueden servir como sitios para la conjugación con 20 agentes terapéuticos (es decir, acoplamiento de fármacos citotóxicos utilizando reactivos específicos de tiol tales como derivados de fármacos de maleimida. La presencia de un agente terapéutico causa impedimento estérico, reduciendo de ese modo adicionalmente la afinidad de la interacción de unión Fc-FcγR. Otras sustituciones en cualquiera de las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reducen la afinidad por los receptores de Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (véanse, p.ej., los documentos US 6.624.821, US 5.624.821).

25 La semivida in vivo de un anticuerpo también puede afectar a sus funciones efectoras. La semivida de un anticuerpo se puede aumentar o disminuir para modificar sus actividades terapéuticas. FcRn es un receptor que es estructuralmente similar al antígeno MHC de Clase I que no se asocia covalentemente con β2-microglobulina. FcRn regula el catabolismo de las IgG y su transcitosis a través de los tejidos (Ghetie y Ward, 2000, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113) La interacción IgG-FcRn tiene lugar a pH 6,0 (pH de las vesículas intracelulares) pero no a pH 7,4 (pH de la sangre); esta interacción permite que las IgG sean recicladas 30 nuevamente a la circulación (Ghetie y Ward, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113). Se ha mapeado la región de IgG1 humana implicada en la unión de FcRn (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Las sustituciones de alanina en las posiciones Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 o Asn434 de la IgG1 humana potencian la unión de FcRn (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Las moléculas de IgG1 que albergan estas sustituciones tienen semividas más largas en suero. En consecuencia, estas moléculas de IgG1 modificadas pueden ser capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras, y por lo tanto ejercer sus eficacias terapéuticas, durante un período de tiempo más largo en comparación con la IgG1 no modificada. Otras sustituciones ilustrativas para aumentar la unión a FcRn incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428. La numeración EU se utiliza para todas las posiciones en la región constante.

40 Los oligosacáridos unidos covalentemente a la Asn297 conservada están implicados en la capacidad de la región Fc de una IgG para unirse a FcγR (Lund et al., 1996, J. Immunol. 157:4963-69; Wright y Morrison, 1997, Trends Biotechnol. 15:26-31). La modificación genética de esta glicofoma en IgG puede mejorar significativamente la ADCC mediada por IgG. La adición de modificaciones bisectantes de N-acetilglucosamina (Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotech. Bioeng. 74:288-94) a esta glicofoma o la eliminación de fucosa (Shields y otros, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-40; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:6591-604; Niwa et al., 45 2004, Cancer Res. 64:2127-33) de esta glicofoma son dos ejemplos de modificación genética de Fc de IgG que mejoran la unión entre Fc de IgG y FcγR, mejorando de ese modo la actividad de la ADCC mediada por Ig.

50 Una sustitución sistémica de aminoácidos expuestos a disolventes de la región Fc de IgG1 humana ha generado variantes de IgG con afinidades de unión a FcγR alteradas (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Cuando se compara con la IgG1 parental, un subconjunto de estas variantes que implican sustituciones en Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334, o Ser298/Glu333/Lys334 a Ala demuestra un aumento tanto en la afinidad de unión hacia FcγR como en la actividad de ADCC (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604; Okazaki et al., 2004, J. Mol. Biol. 336: 1239-49).

55 La actividad de fijación del complemento de los anticuerpos (tanto la unión a C1q como la actividad de CDC) se puede mejorar mediante sustituciones en Lys326 y Glu333 (Idusogie et al., 2001, J. Immunol. 166:2571-2575). Las mismas sustituciones en una cadena principal de IgG2 humana pueden convertir un isotipo de anticuerpo que se une escasamente a C1q y tiene una actividad de activación del complemento muy deficiente en uno que puede unirse a C1q y mediar en CDC (Idusogie et al., 2001, J. Immunol. 166:2571-75). También se han aplicado otros diversos métodos para mejorar la actividad de fijación del complemento de los anticuerpos. Por ejemplo, el injerto de una porción de cola carboxilo terminal de 18 aminoácidos de las IgM a los extremos carboxilo de la IgG potencia enormemente su actividad de CDC. Esto se observa incluso con IgG4, que normalmente no tiene actividad 60 detectable de CDC (Smith et al., 1995, J. Immunol. 154:2226-36). Además, sustituyendo la Ser444 ubicada cerca del

extremo carboxi-terminal de la cadena pesada de IgG1 por Cys se indujo la dimerización cola-a-cola de IgG1 con un aumento de 200 veces de la actividad de CDC sobre la IgG1 monomérica (Shopes et al., 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22). Además, una construcción biespecífica de diacuerpo con especificidad para C1q también confiere actividad de CDC (Kontermann et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

- 5 La actividad del complemento se puede reducir mutando al menos uno de los restos de aminoácido 318, 320 y 322 de la cadena pesada a un resto que tiene una cadena lateral diferente, tal como Ala. Otros restos no iónicos sustituidos con alquilo, tales como Gly, Ile, Leu o Val, o restos aromáticos no polares tales como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de cualquiera de los tres restos también reducen o anulan la unión de C1q. Se pueden utilizar Ser, Thr, Cys y Met en los restos 320 y 322, pero no en 318, para reducir o anular la actividad de unión de C1q. La sustitución del resto 318 (Glu) por un resto polar puede modificar, pero no anular, la actividad de unión de C1q. El remplazo del resto 297 (Asn) por Ala da como resultado la eliminación de la actividad lítica, pero solo reduce ligeramente (aproximadamente, tres veces más débil) la afinidad por C1q. Esta alteración destruye el sitio de glicosilación y la presencia de carbohidratos que se requiere para la activación del complemento. Cualquier otra sustitución en este sitio también destruye el sitio de glicosilación. Las siguientes mutaciones y cualquier combinación de las mismas también reducen la unión de C1q: D270A, K322A, P329A y P311S (véase el documento WO 06/036291).

La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de restos que ocupen posiciones polimorfas en alotipos naturales. Además, pueden estar presentes hasta 1, 2, 5 o 10 mutaciones en relación con una región constante humana natural, tales como las indicadas anteriormente para reducir la unión del receptor de Fc gamma o aumentar la unión a FcRN.

#### 20 D. Expresión de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos humanizados o quiméricos se producen típicamente por expresión recombinante. Las construcciones polinucleotídicas recombinantes incluyen típicamente una secuencia de control de la expresión operablemente unida a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpos, que incluyen regiones promotoras heterólogas o asociadas de forma natural. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células anfitrionas eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al anfitrión apropiado, el anfitrión se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y la recogida y purificación de los anticuerpos que presentan reacción cruzada.

30 Las células de mamífero son un anfitrión preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). En la técnica se han desarrollado varias líneas celulares anfitrionas adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO (p.ej., DG44), varias líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas no productores de anticuerpos incluyendo Sp2/0 y NS0. Preferiblemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de información del procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus y virus del papiloma bovino. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

40 Los anticuerpos humanos contra la proteína CD33 se pueden proporcionar mediante una variedad de técnicas descritas a continuación. Los métodos para producir anticuerpos humanos incluyen el método del trioma de Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, Patente de Estados Unidos Núm. 4.634.664; y Engleman et al., Patente de Estados Unidos 4.634.666; el uso de ratones transgénicos que incluyen genes de inmunoglobulina humana (véanse, p.ej. Lonberg et al., WO93/12227 (1993); documentos US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, documento WO 91/10741 (1991) y métodos de visualización en fagos (véanse, p.ej. Dower et al., documento WO 91/17271 y McCafferty et al., documentos WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332).

50 Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen la purificación por HPLC, la cromatografía en columna y la electroforesis en gel (véase en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

#### IV. Ácidos nucleicos

La invención proporciona adicionalmente ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras humanizadas descritas anteriormente. Típicamente, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado a las cadenas pesadas y ligeras maduras. Las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos pueden estar en un enlace operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias codificantes, tales como un promotor, un potenciador, un sitio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la transcripción. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras se pueden presentar en forma aislada o se pueden

clonar en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos solapantes. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras se pueden unir en forma de un ácido nucleico contiguo, p.ej., dentro de un vector de expresión, o se pueden separar, p.ej., cada uno clonado en su propio vector de expresión.

5 En una realización, esta descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. Este polinucleótido aislado puede codificar adicionalmente una región constante de la cadena pesada de IgG humana. El isotipo de la región constante de IgG es, p.ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una realización, el isotipo de la región constante de IgG es IgG1. En otra realización, la región constante de IgG1 codificada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución en el resto 239, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, es decir, S239C. La descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y adicionalmente, una célula anfitriona que comprende ese vector de expresión. En algunas realizaciones, la célula anfitriona es una célula anfitriona de mamífero, p.ej., una célula CHO.

15 En otra realización, esta descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Este polinucleótido aislado puede codificar adicionalmente una región constante de la cadena ligera de IgG humana. El isotipo de la región constante de la cadena ligera de IgG es, p.ej., una región constante kappa. La descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y adicionalmente, una célula anfitriona que comprende ese vector de expresión. En algunas realizaciones, la célula anfitriona es una célula anfitriona de mamífero, p.ej., una célula CHO. En otra realización, esta descripción proporciona un polinucleótido o polinucleótidos aislados que codifican una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera que forman un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD33 humana. Esta descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido o polinucleótidos aislados que codifican la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. También se proporciona una célula anfitriona que comprende el vector o vectores de expresión. La célula anfitriona es preferiblemente una célula de mamífero, p.ej., una célula CHO.

En otra realización, esta descripción proporciona primeros y segundos vectores que comprenden un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera que forman un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se unen específicamente a CD33 humana. Se proporcionan células anfitrionas que comprenden los vectores, preferiblemente células anfitrionas de mamífero, tales como una célula CHO.

#### 40 V. Productos conjugados de anticuerpos con fármacos

Los anticuerpos anti-CD33 se pueden conjugar con radicales citotóxicos para formar productos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Los radicales particularmente adecuados para la conjugación a anticuerpos son agentes citotóxicos (p.ej., agentes quimioterapéuticos), enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radioactivos o toxinas (estos radicales se denominan colectivamente agentes terapéuticos o fármacos). Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD33 se puede conjugar con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, o una toxina (p.ej., un agente citostático o citocida tal como, p.ej., abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria). Los ejemplos de clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, ligandos de fijación al surco menor del ADN, agentes alquilantes de ADN e inhibidores de tubulina. Los agentes citotóxicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinas y maitansinoides (p.ej., DM1 y DM4), taxanos, benzodiazepinas (p.ej., pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD), indolinobenzodiazepinas y oxazolidinobenzodiazepinas) y alcaloides de vinca. Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos, son bien conocidas. (Véase, p.ej., Alley et al., Current Opinion in Chemical Biology 2010 14:1-9; Senter, Cancer J., 2008, 14 (3):154-169).

El agente terapéutico (p.ej., agente citotóxico) se puede conjugar con el anticuerpo de una manera que reduce su actividad a menos que se separe del anticuerpo (p.ej. mediante hidrólisis, mediante degradación de anticuerpo, o mediante un agente de escisión). Tal agente terapéutico se puede anclar al anticuerpo a través de un conector. Un agente terapéutico conjugado con un conector también se denomina en la presente memoria un conector de fármaco. La naturaleza del conector puede variar ampliamente. Los componentes que componen el conector se eligen en función de sus características, que pueden estar dictadas en parte por las condiciones del sitio en el que se suministra el producto conjugado.

El agente terapéutico se puede anclar al anticuerpo con un conector escindible que sea sensible a la escisión en el entorno intracelular de la célula cancerosa que expresa anti-CD33 pero no sea sustancialmente sensible al entorno extracelular, de manera que el producto conjugado se escinda del anticuerpo cuando sea internalizado por la célula cancerosa que expresa anti-CD33 (p.ej., en el entorno endosómico, o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a la proteasa, en el entorno lisosómico o en el entorno caveolar). El agente terapéutico también se puede unir al anticuerpo con un conector no escindible. Como se indica, el conector puede comprender una unidad escindible. En algunas de tales realizaciones, la estructura y/o secuencia de la unidad escindible se selecciona de manera que sea escindida por la acción de las enzimas presentes en el sitio diana (p.ej., la célula diana). En otras realizaciones, también se pueden utilizar unidades escindibles que se puedan escindir por cambios en el pH (p.ej., lábiles a los ácidos o bases), la temperatura o tras la irradiación (p.ej., fotolábiles).

En algunas realizaciones, la unidad escindible puede comprender un aminoácido o una secuencia contigua de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos puede ser el sustrato diana para una enzima.

En algunos aspectos, la unidad escindible es una unidad peptídica y tiene al menos dos aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina (véase, p.ej., Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Muy típicamente son unidades escindibles que son escindibles por enzimas que están presentes en células que expresan anti-CD33, es decir, un conector escindible por enzimas. Por consiguiente, el conector se puede escindir mediante una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo una proteasa lisosómica o endosómica. Por ejemplo, se puede utilizar un conector escindible por la proteasa dependiente de tiol catepsina B, que está altamente expresada en tejido canceroso (p.ej., un conector que comprende un péptido Phe-Leu o Val-Cit o un péptido Val-Ala).

En algunas realizaciones, el conector comprenderá una unidad escindible (p.ej., una unidad peptídica) y la unidad escindible se conjugará directamente con el agente terapéutico. En otras realizaciones, la unidad escindible se conjugará con el agente terapéutico a través de una unidad funcional adicional, p.ej., una unidad espaciadora autoinmolable o una unidad espaciadora no autoinmolable. Una unidad espaciadora no autoinmolable es aquella en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad de fármaco después de la escisión de una unidad escindible (p.ej., aminoácido) del producto conjugado de anticuerpo y fármaco. Para liberar el fármaco, tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana para escindir la unidad espaciadora del fármaco.

Con una unidad espaciadora autoinmolable, el fármaco se libera sin la necesidad de que el fármaco pase por una etapa de hidrólisis por separado. En una realización, en donde el conector comprende una unidad escindible y un grupo autoinmolable, la unidad escindible es escindible por la acción de una enzima y después de la escisión de la unidad escindible, el grupo o los grupos autoinmolables liberan el agente terapéutico. En algunas realizaciones, la unidad escindible del conector se conjugará directa o indirectamente con el agente terapéutico en un extremo y en el otro extremo se conjugará directa o indirectamente con el anticuerpo. En algunas de tales realizaciones, la unidad escindible se conjugará directa o indirectamente (p.ej., a través de una unidad espaciadora autoinmolable o no autoinmolable) con el agente terapéutico en un extremo y en el otro extremo se conjugará con el anticuerpo a través de una unidad ensanchadora. Una unidad ensanchadora une el anticuerpo al resto del fármaco y/o al conector de fármaco. En una realización, la conexión entre el anticuerpo y el resto del fármaco o el conector de fármaco es a través de un grupo maleimido, p.ej., a través de un conector maleimidocaproilo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se unirá al fármaco a través de un disulfuro, por ejemplo, los productos conjugados de maitansinoide unidos por disulfuro SPDB-DM4 y SPP-DM1.

La conexión entre el anticuerpo y el conector puede ser a través de varias rutas diferentes, p.ej., a través de un enlace tioéter, a través de un enlace disulfuro, a través de un enlace amida, o a través de un enlace éster. En una realización, la conexión entre el anticuerpo anti-CD33 y el conector se forma entre un grupo tiol de un resto de cisteína del anticuerpo y un grupo maleimido del conector. En algunas realizaciones, los enlaces intercatenarios del anticuerpo se convierten en grupos tiol libres antes de la reacción con el grupo funcional del conector. En algunas realizaciones, se introduce un resto de cisteína en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo y se hace reaccionar con el conector. Las posiciones para la inserción de cisteína por sustitución en cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos incluyen las descritas en la Solicitud de Estados Unidos Publicada Núm. 2007-0092940 y en la Publicación de Patente Internacional WO2008070593.

En algunas realizaciones, los productos conjugados de anticuerpo-fármaco tienen la siguiente fórmula I:



en donde L es un anticuerpo anti-CD33, LU es una unidad conectora y D es una unidad de fármaco (es decir, el agente terapéutico). El subíndice p varía de 1 a 20. Tales productos conjugados comprenden un anticuerpo anti-CD33 unido covalentemente a al menos un fármaco a través de un conector. La unidad Conectora está conectada en un extremo al anticuerpo y en el otro extremo al fármaco.

La carga de fármaco está representada por p, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 unidades de fármaco (D) por anticuerpo. El experto en la técnica apreciará que, en

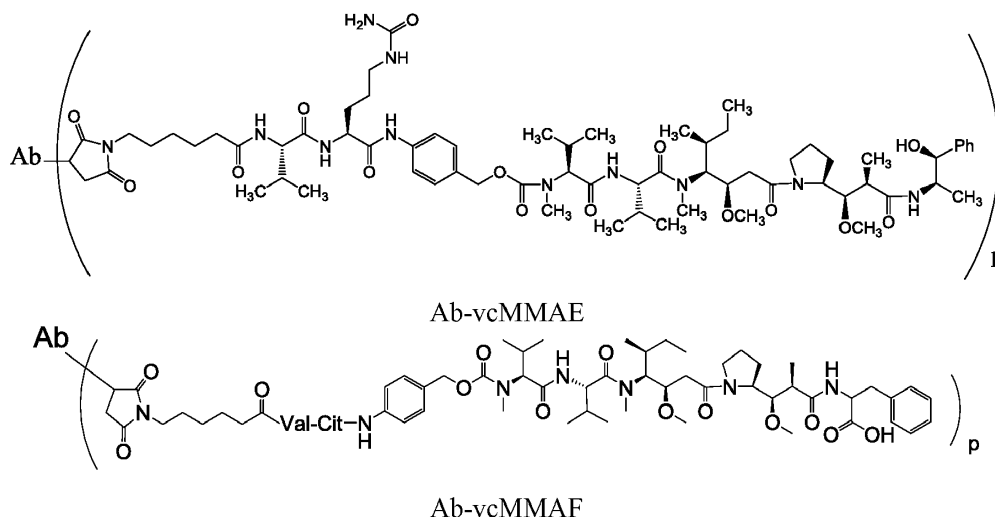
algunos aspectos, el subíndice  $p$  variará de 1 a 20 (es decir, valores tanto enteros como no enteros de 1 a 20). El experto en la técnica apreciará que, en algunos aspectos, el subíndice  $p$  será un número entero de 1 a 20, y representará el número de conectores de fármaco en un anticuerpo singular. En otros aspectos,  $p$  representa el número promedio de moléculas de conector de fármaco por anticuerpo, p.ej., el número promedio de conectores de fármaco por anticuerpo en una mezcla o composición de reacción (p.ej., composición farmacéutica), y puede ser un valor de número entero o no entero. En consecuencia, en algunos aspectos, para las composiciones (p.ej., composiciones farmacéuticas),  $p$  representa la carga media de fármaco de los productos conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición, y  $p$  varía de 1 a 20.

En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 fármacos por anticuerpo. En algunas realizaciones,  $p$  es 1. En algunas realizaciones,  $p$  es 2. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 fármacos por anticuerpo. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. En algunas realizaciones,  $p$  es aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 fármacos por anticuerpo.

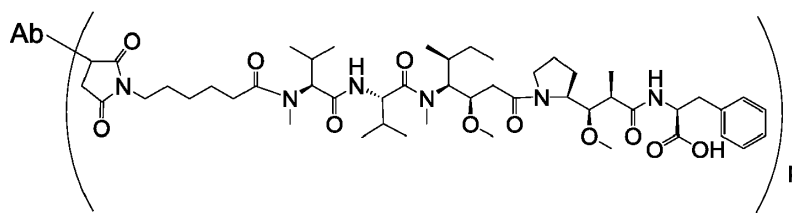
El número promedio de fármacos por unidad de anticuerpo en una preparación a partir de una reacción de conjugación se puede caracterizar mediante medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA, HIC y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de productos conjugados en términos de  $p$ .

Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco ilustrativos incluyen productos conjugados de anticuerpo-fármaco basados en auristatina, es decir, productos conjugados en donde el componente del fármaco es un fármaco de auristatina. Las auristatinas se unen a la tubulina, se ha demostrado que interfieren en la dinámica de los microtúbulos y en la división nuclear y celular, y tienen actividad anticancerosa. Típicamente, el producto conjugado de anticuerpo-fármaco basado en auristatina comprende un conector entre el fármaco de auristatina y el anticuerpo anti-CD33. Las auristatinas se pueden unir al anticuerpo anti-CD33 en cualquier posición adecuada para la conjugación con un conector. El conector puede ser, por ejemplo, un conector escindible (p.ej., un conector peptídico) o un conector no escindible (p.ej., un conector liberado por degradación del anticuerpo). La auristatina puede ser auristatina E o un derivado de la misma. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen MMAF (monometil auristatina F) y MMAE (monometil auristatina E). La síntesis y la estructura de las auristatinas ilustrativas se describen en las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 7.659.241, 7.498.298, 2009-0111756, 2009-0018086 y 7.968.687.

Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco basados en auristatina incluyen los productos conjugados de anticuerpo-fármaco vcMMAE, vcMMAF y mcMMAF como se muestra a continuación, en donde Ab es un anticuerpo como se describe en la presente memoria y val-cit representa el dipéptido valina-citrulina:





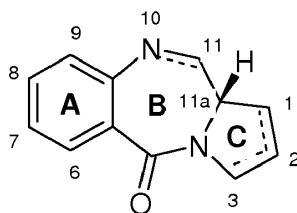


Ab-mcMMAF

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La carga de fármaco está representada por p, el número de moléculas de conector de fármaco por anticuerpo. Dependiendo del contexto, p puede representar el número promedio de moléculas de conector de fármaco por anticuerpo, también referido a la carga promedio de fármaco. La variable p varía de 1 a 20 y es preferiblemente de 1 a 8. En algunas realizaciones preferidas, cuando p representa la carga promedio de fármaco, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, o aproximadamente 5. En algunos aspectos, el anticuerpo se conjuga con el conector a través de un átomo de azufre de un resto de cisteína. En algunos aspectos, el resto de cisteína es uno que se ha modificado en el anticuerpo. En otros aspectos, el resto de cisteína es un resto de cisteína disulfuro intercatenario.

Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco ilustrativos incluyen productos conjugados de anticuerpo-fármaco basados en PBD; es decir, productos conjugados de anticuerpo-fármaco en donde el componente del fármaco es un fármaco PBD.

Las PBD tienen la estructura general:



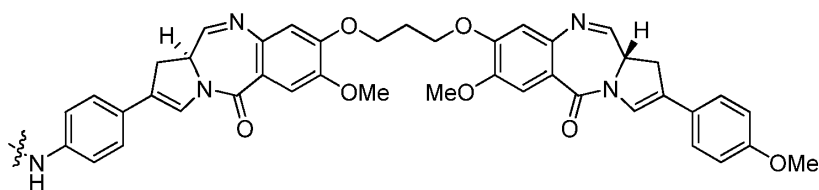
Se diferencian en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos A aromáticos como en los anillos C de pirrol, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o un éter metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11, que es el centro electrófilo responsable de la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición quiral C11a que les proporciona un giro a la derecha cuando se observan desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les proporciona la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN de la forma B, lo que conduce a un ajuste perfecto en el sitio de unión. La capacidad de las PBD para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

La actividad biológica de estas moléculas se puede potenciar uniendo dos unidades de PBD juntas a través de sus funcionalidades C8/C'-hidroxilo por medio de un conector de alquileo flexible. Se cree que los dímeros de PBD forman lesiones en el ADN selectivas de la secuencia tales como el entrecruzamiento entre hebras 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómico, que se cree que es principalmente responsable de su actividad biológica.

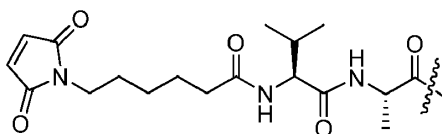
En algunas realizaciones, los productos conjugados de anticuerpo-fármaco basados en PBD comprenden un dímero de PBD unido a un anticuerpo anti-CD33. Los monómeros que forman el dímero de PBD pueden ser iguales o diferentes, es decir, simétricos o asimétricos. El dímero de PBD se puede unir al anticuerpo anti-CD33 en cualquier posición adecuada para la conjugación con un conector. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el dímero de PBD tendrá un sustituyente en la posición C2 que proporciona un ancla para unir el compuesto al anticuerpo anti-CD33. En realizaciones alternativas, la posición N10 del dímero de PBD proporcionará el ancla para unir el compuesto al anticuerpo anti-CD33.

Típicamente, el producto conjugado de anticuerpo-fármaco basado en PBD comprende un conector entre el fármaco PBD y el anticuerpo anti-CD33. El conector puede comprender una unidad escindible (p.ej., un aminoácido o una secuencia contigua de aminoácidos que es un sustrato diana para una enzima) o un conector no escindible (p.ej., un conector liberado por degradación del anticuerpo). El conector puede comprender adicionalmente un grupo maleimido para el enlace al anticuerpo, p.ej., maleimidocaproilo. El conector puede, en algunas realizaciones, comprender adicionalmente un grupo autoinmolable, tal como, por ejemplo, una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB).

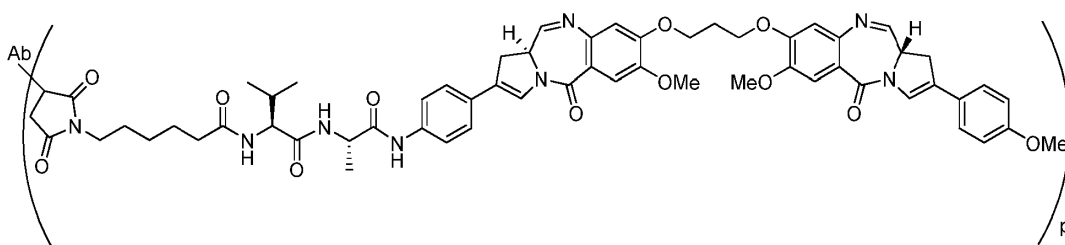
Una PBD ilustrativa para su uso como producto conjugado se describe en la Solicitud Internacional Núm. WO 2011/130613 y es la siguiente, en donde la línea ondulada indica el sitio de unión al conector:



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Un conector ilustrativo es el siguiente, en donde línea ondulada indica el sitio de unión al fármaco y el anticuerpo está unido a través del grupo maleimido.



- 5 Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco basados en PBD ilustrativos incluyen productos conjugados de anticuerpo-fármaco como se muestra a continuación, en donde Ab es un anticuerpo como se describe en la presente memoria:



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La carga de fármaco está representada por p, el número de moléculas de conector de fármaco por anticuerpo. Dependiendo del contexto, p puede representar el número promedio de moléculas de fármaco-conector por anticuerpo, también referido con respecto a la carga promedio de fármaco. La variable p varía de 1 a 20 y es preferiblemente de 1 a 8. En algunas realizaciones preferidas, cuando p representa la carga promedio de fármaco, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, o aproximadamente 5. En algunos aspectos, el anticuerpo se conjuga con el conector de fármaco a través de un átomo de azufre de un resto de cisteína que se modifica en el anticuerpo. En algunos aspectos, el resto de cisteína se modifica en el anticuerpo en la posición 239 (IgG1) según lo determinado por el índice EU (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1987 y 1991).

#### VI. Otros anticuerpos contra CD33

- 20 Además de las formas humanizadas de los anticuerpos m2H12 comentados anteriormente, se pueden utilizar en algunos de los métodos de la invención otros anticuerpos que se unen a un dominio extracelular de CD33, particularmente en el tratamiento del cáncer. Las formas quiméricas o sometidas a técnicas de remodelación de la superficie ("vennered") de estos anticuerpos se pueden preparar mediante métodos convencionales resumidos a continuación.

- 25 Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (p.ej., un ratón) se combinan con regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas. Tales anticuerpos conservan sustancialmente o completamente la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, y son aproximadamente dos tercios de la secuencia humana.

- 30 Un anticuerpo sometido a técnicas de remodelación de la superficie es un tipo de anticuerpo humanizado que conserva algunas y normalmente todas las CDR y algunos de los restos del marco de la región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero reemplaza otros restos del marco de la región variable que pueden contribuir a epítopos de células B o T, por ejemplo, restos expuestos (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) por restos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDR son completamente o sustancialmente de un anticuerpo no humano y los marcos de la región variable del anticuerpo no humano se hacen más parecidos a los humanos mediante las sustituciones.

- 35 Se puede seleccionar cualquiera de los anticuerpos para que tenga una especificidad de epítipo igual a, o solapante a la de un anticuerpo ilustrativo, tal como el anticuerpo m2H12, mediante un ensayo de unión competitiva, tal como se describe en los Ejemplos, o de otro modo. Los anticuerpos preferidos tienen la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo m2H12. Los expertos en la técnica pueden identificar un epítipo unido con un anticuerpo utilizando una variedad de métodos. Por ejemplo, el barrido de oligopéptidos basado en matrices o el análisis pepscan utilizan

una biblioteca de secuencias oligo-peptídicas de segmentos solapantes y no solapantes de un antígeno diana y prueban su capacidad para unirse al anticuerpo de interés. Véase, p.ej., Geysen et al., PNAS 81:3998-4002 (1984). Los epítomos no lineales se pueden identificar utilizando, por ejemplo, la tecnología CLIPS™, una variación del barrido de oligopéptidos basado en matrices. Véase, p.ej., Timmerman et al., Open Vaccine J. 2:56-67 (2009). La proteína antigénica también se puede mutagenizar y utilizar a continuación para evaluar la unión con el anticuerpo de interés. Se puede utilizar la mutagénesis dirigida al sitio sistemática de proteínas o se puede elaborar una biblioteca de mutaciones y utilizarla para escrutar la unión del anticuerpo. Las bibliotecas de mutaciones se pueden adquirir, p.ej., de Integral Molecular. Se puede utilizar MS de intercambio de hidrógeno/deuterio de amida para identificar epítomos. Los antígenos de interés se colocan en agua deuterada y se marcan con deuterones. La proteína se digiere a continuación con una proteasa y los fragmentos peptídicos resultantes se someten a análisis de espectrometría de masas. El antígeno también se evalúa en presencia de un anticuerpo y las diferencias en el marcaje de los fragmentos peptídicos indican zonas de unión del anticuerpo.

#### VII. Aplicaciones Terapéuticas

Los anticuerpos derivados del anticuerpo 2H12 murino, p.ej., anticuerpos quiméricos o humanizados, solos o en forma de productos conjugados de fármacos con el anticuerpo contra CD33 de los mismos, se pueden utilizar para tratar el cáncer. Algunos de tales cánceres muestran niveles detectables de CD33 medidos a nivel de la proteína (p.ej., mediante inmunoensayo utilizando uno de los anticuerpos ilustrados) o a nivel del ARNm. Algunos de tales cánceres muestran niveles elevados de CD33 con respecto al tejido no canceroso del mismo tipo, preferiblemente del mismo paciente. Un nivel ilustrativo de CD33 en células cancerosas susceptibles de tratamiento es de 5.000-150.000 moléculas de CD33 por célula, aunque se pueden tratar niveles más altos o más bajos. Opcionalmente, se mide un nivel de CD33 en un cáncer antes de realizar el tratamiento.

Los ejemplos de cánceres asociados con la expresión de CD33 y susceptibles de tratamiento incluyen enfermedades mieloides tales como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), otros trastornos mieloproliferativos, que incluyen leucemia mielomonocítica crónica y trastornos mieloproliferativos crónicos, leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia trombocítica, síndrome mielodisplásico, leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (LLA-preB), leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras (LLA-preT), mieloma múltiple (MM), enfermedad de mastocitos incluyendo leucemia de mastocitos y sarcoma de los mastocitos, sarcomas mieloides, anemia refractaria, síndrome de preleucemia, leucemia linfoide o leucemia indiferenciada. El tratamiento también se puede aplicar a pacientes que no han recibido tratamiento previo, que son refractarios a los tratamientos convencionales (p.ej., quimioterapia o MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina), o que han recaído después de una respuesta a tales tratamientos.

Los anticuerpos contra CD33 derivados del anticuerpo 2H12 murino, que incluyen anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados tales como anticuerpos h2H12, se pueden utilizar para tratar cánceres que expresan la proteína CD33. En una realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia mieloide aguda (LMA) positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con LMA positiva para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia mieloide crónica (LMC) positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con LMC positiva para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con LMMC crónica positiva para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia tiroidea positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con leucemia tiroidea positiva para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con síndrome mielodisplásico positivo para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con síndrome mielodisplásico positivo para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con trastorno mieloproliferativo positivo para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con trastorno mieloproliferativo positivo para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con anemia refractaria positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con anemia refractaria positiva para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con síndrome de preleucemia positivo para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con síndrome de preleucemia positivo para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia linfoide positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con leucemia linfoide positiva para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia no diferenciada positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con leucemia no diferenciada positiva para CD33. En una realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (LLA-preB) positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el

tratamiento de un sujeto con LLA-pre-B positiva para CD33. En una realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras (LLA-preT) positiva para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con LLA-preT positiva para CD33. En una realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con mieloma múltiple (MM) positivo para CD33. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con MM positivo para CD33. En una realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado de anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con enfermedad de mastocitos positiva para CD33 que incluye leucemia de mastocitos y sarcoma de mastocitos. En una realización adicional, el anticuerpo h2H12 se utiliza para el tratamiento de un sujeto con enfermedad de mastocitos positiva para CD33 que incluye leucemia de mastocitos y sarcoma de mastocitos.

El anticuerpo contra CD33 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo no conjugado o conjugado, p.ej., un producto conjugado de fármaco y anticuerpo contra CD33. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 puede ser un anticuerpo 2H12 humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 puede ser un anticuerpo que compite con un anticuerpo 2H12 murino, humanizado o quimérico por la unión específica a CD33.

Los anticuerpos contra CD33 derivados del anticuerpo 2H12 murino, que incluyen anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados tales como h2H12, se pueden conjugar con un agente terapéutico y se pueden utilizar para el tratamiento de sujetos con cánceres positivos para CD33. Se proporcionan en la presente memoria ejemplos de agentes terapéuticos, que incluyen agentes terapéuticos activos, p.ej., auristatinas, y agentes terapéuticos altamente activos, p.ej., PBD. Un anticuerpo h2H12 conjugado con un agente terapéutico activo, es decir, un producto conjugado de anticuerpo h2H12-fármaco (ADC), se puede utilizar para el tratamiento de un sujeto con cáncer positivo para CD33. Un anticuerpo h2H12 conjugado con una auristatina se puede utilizar para el tratamiento de un sujeto con cáncer positivo para CD33. Un anticuerpo h2H12 conjugado con un agente terapéutico altamente activo se puede utilizar para el tratamiento de un sujeto con cáncer positivo para CD33. Un anticuerpo h2H12 conjugado con un PBD se puede utilizar para el tratamiento de un sujeto con cáncer positivo para CD33.

Algunas células cancerosas desarrollan resistencia a un agente terapéutico después de que el aumento de la expresión de una proteína aumente el flujo de salida del agente terapéutico fuera de la célula cancerosa. Tales proteínas incluyen glicoproteína P, proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos, proteína relacionada con la resistencia pulmonar y proteína de resistencia del cáncer de mama. La detección de la resistencia a los fármacos en las células cancerosas puede ser realizada por los expertos en la técnica. Los anticuerpos o ensayos que detectan las proteínas del flujo de salida están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Promega, Millipore, Abcam y Sigma-Aldrich. En una realización, se utiliza un anticuerpo derivado de un anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con un cáncer resistente a múltiples fármacos, p.ej., un cáncer resistente a múltiples fármacos positivo para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo 2H12 murino para el tratamiento de un sujeto con un cáncer resistente a múltiples fármacos, p.ej., un cáncer resistente a múltiples fármacos positivo para CD33. En una realización, se utiliza un anticuerpo h2H12 para el tratamiento de un sujeto con un cáncer resistente a múltiples fármacos, p.ej., un cáncer resistente a múltiples fármacos positivo para CD33. En una realización adicional, se utiliza un ADC de h2H12 para el tratamiento de un sujeto con un cáncer resistente a múltiples fármacos, p.ej., un cáncer resistente a múltiples fármacos positivo para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo h2H12 conjugado con un agente terapéutico altamente activo para el tratamiento de un sujeto con un cáncer resistente a múltiples fármacos, p.ej., un cáncer resistente a múltiples fármacos positivo para CD33. En otra realización, se utiliza un anticuerpo h2H12 conjugado con un PBD para el tratamiento de un sujeto con un cáncer resistente a múltiples fármacos, p.ej., un cáncer resistente a múltiples fármacos positivo para CD33. En una realización adicional, se utiliza un anticuerpo h2H12 conjugado con un PBD para el tratamiento de un sujeto con una leucemia mielóide aguda (LMA) positiva a CD33 resistente a múltiples fármacos.

Los anticuerpos humanizados o quiméricos derivados del anticuerpo 2H12 murino, solos o en forma de productos conjugados de los mismos, se administran en un régimen eficaz que significa una dosificación, una vía de administración y una frecuencia de administración que retrasan el inicio, reducen la gravedad, inhiben el deterioro adicional y/o mejoran al menos un signo o síntoma de cáncer. Si un paciente ya está padeciendo cáncer, el régimen puede ser referido como un régimen terapéuticamente eficaz. Si el paciente tiene un riesgo elevado de cáncer en relación con la población general pero aún no experimenta síntomas, el régimen puede ser referido como un régimen profilácticamente eficaz. En algunos casos, se puede observar una eficacia terapéutica o profiláctica en un paciente individual en relación con los controles históricos o la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede demostrar en un ensayo preclínico o clínico en una población de pacientes tratados en relación con una población de control de pacientes no tratados.

Las dosis ilustrativas para un anticuerpo monoclonal son de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg del peso corporal del paciente, más típicamente de 1 mg/kg a 30 mg/kg, de 1 mg/kg a 20 mg/kg, de 1 mg/kg a 15 mg/kg, de 1 mg/kg a 12 mg/kg, o de 1 mg/kg a 10 mg/kg, o de 2 mg/kg a 30 mg/kg, de 2 mg/kg a 20 mg/kg, de 2 mg/kg a 15 mg/kg, de 2 mg/kg a 12 mg/kg, o de 2 mg/kg a 10 mg/kg, o de 3 mg/kg a 30 mg/kg, de 3 mg/kg a 20 mg/kg, de 3 mg/kg a 15 mg/kg, de 3 mg/kg a 12 mg/kg o de 3 mg/kg a 10 mg/kg. Las dosificaciones ilustrativas para productos conjugados de fármaco y anticuerpo monoclonal activo, p.ej., auristatinas, son de 1 mg/kg a 7,5 mg/kg o de 2 mg/kg a 7,5 mg/kg o de 3 mg/kg a 7,5 mg/kg del peso corporal del sujeto, o de 0,1-20, o de 0,5-5 mg/kg de peso corporal (p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg) o 10-1.500 o 200-1.500 mg como dosis fija. Las dosis ilustrativas para productos conjugados de

fármaco y anticuerpo monoclonal muy activo, p.ej. PBD, son de 1,0 µg/kg a 1,0 mg/kg, o de 1,0 µg/kg a 500,0 µg/kg del peso corporal del sujeto. En algunos métodos, al paciente se le administra a continuación anticuerpo o ADC cada dos, tres o cuatro semanas. La dosificación depende de la frecuencia de administración, el estado del paciente y la respuesta al tratamiento previo, si corresponde, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. La administración también se puede localizar directamente en un tumor. Se prefiere la administración en la circulación sistémica por administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, mediante infusión durante un período tal como 30-90 minutos o mediante una única inyección en bolo.

La frecuencia de administración depende de la semivida del anticuerpo o del producto conjugado de anticuerpo-fármaco en la circulación, del estado del paciente y de la vía de administración, entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a cambios en el estado del paciente o la progresión del cáncer que se está tratando. Una frecuencia ilustrativa para administración intravenosa es entre dos veces por semana y trimestralmente durante un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Otras frecuencias ilustrativas para la administración intravenosa incluyen una vez a la semana o una vez al mes durante un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ilustrativa es entre diaria y mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

El número de dosis administradas depende de la naturaleza del cáncer (p.ej., si presenta síntomas agudos o crónicos) y de la respuesta del trastorno al tratamiento. Para los trastornos agudos o las exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, a menudo son suficientes entre 1 y 10 dosis. A veces, una sola dosis en bolo, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o una exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento se puede repetir durante la recurrencia de un trastorno agudo o una exacerbación aguda. Para trastornos crónicos, se puede administrar un anticuerpo a intervalos regulares, p.ej., semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años, o durante la vida del paciente. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas y se fabrican en condiciones de GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una sola administración). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la ruta de administración elegida. Para su inyección, los anticuerpos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir la incomodidad en el sitio de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su constitución con un vehículo adecuado, p.ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. La concentración de anticuerpo en una formulación líquida puede ser, p.ej., de 0,01 a 10 mg/ml, tal como 1,0 mg/ml.

El tratamiento con anticuerpos de la invención se puede combinar con quimioterapia, radiación, tratamiento con células madre, cirugía, otros tratamientos eficaces contra el trastorno que se está tratando. Las clases útiles de otros agentes que se pueden administrar con anticuerpos humanizados contra CD33 incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra otros receptores expresados en células cancerosas, agentes antitubulina (p.ej., auristatinas), ligandos de fijación al surco menor del ADN (p.ej., PBD), inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (p.ej., complejos de platino tales como *cis*-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropinas, nitrosoureas, platinos, compuestos de pre-formación, antimetabolitos de purina, puomicinas, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa y alcaloides de vinca.

El tratamiento con un anticuerpo derivado del anticuerpo 2H12 murino, p.ej., un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o el anticuerpo h2H12, opcionalmente combinado con cualquiera de los otros agentes o regímenes descritos anteriormente solo o en forma de producto conjugado de anticuerpo y fármaco, puede aumentar la mediana de supervivencia libre de progresión o el tiempo de supervivencia general de pacientes con cáncer (p.ej., LLA, LMC, LMMC), especialmente cuando presenta recidiva o es refractario, en al menos 30% o 40% pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o incluso 100% o más, en comparación con el mismo tratamiento (p.ej., quimioterapia) pero sin el anticuerpo derivado del anticuerpo 2H12 murino, solo o en forma de un producto conjugado de anticuerpo-fármaco. Además o alternativamente, el tratamiento (p.ej., quimioterapia convencional) que incluye el anticuerpo derivado del anticuerpo 2H12 murino, solo o en forma de un producto conjugado de anticuerpo-fármaco, puede aumentar la tasa de respuesta completa, la tasa de respuesta parcial o la tasa de respuesta objetivo (completa + parcial) de pacientes con tumores en al menos 30% o 40% pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o incluso 100% en comparación con el mismo tratamiento (p.ej., quimioterapia) pero sin el anticuerpo derivado de anticuerpo 2H12 murino.

Típicamente, en una prueba clínica (p.ej., una prueba de fase II, fase II/III o fase III), los aumentos antes

mencionados en la mediana de supervivencia libre de progresión y/o tasa de respuesta de los pacientes tratados con terapia convencional más el anticuerpo derivado del anticuerpo 2H12 murino, con relación al grupo control de pacientes que reciben terapia convencional sola (o más placebo), son estadísticamente significativos, por ejemplo, en el nivel  $p = 0,05$  o  $0,01$  o incluso  $0,001$ . Las tasas de respuesta completa y parcial se determinan mediante criterios objetivos comúnmente utilizados en pruebas clínicas para el cáncer, p.ej., enumerados o aceptados por el Instituto Nacional del Cáncer y/o la Administración de Alimentos y Medicamentos.

#### VIII. Otras aplicaciones

Los anticuerpos anti-CD33 descritos en la presente memoria se pueden utilizar para detectar CD33 en el contexto del diagnóstico o tratamiento clínico o en investigación. La expresión de CD33 en un cáncer proporciona una indicación de que el cáncer es susceptible de tratamiento con los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos también se pueden comercializar como reactivos de investigación para la investigación de laboratorio en la detección de células que portan CD33 y su respuesta a diversos estímulos.

En tales usos, los anticuerpos monoclonales se pueden marcar con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas con espín, enzimas o radioisótopos, y se pueden proporcionar en forma de kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de CD33. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, m2h12 y las versiones quiméricas o humanizadas del mismo, p.ej. h2H12, se pueden utilizar para detectar la expresión de la proteína CD33 y determinar si un cáncer es susceptible de tratamiento con ADC para CD33. Como ejemplo, el 2H12 murino y las versiones quiméricas o humanizadas del mismo, p.ej., h2H12, se pueden utilizar para detectar la expresión de CD33 en linfocitos, linfoblastos, monocitos, mielomonocitos u otras células que expresan CD33. Los anticuerpos también se pueden utilizar para purificar la proteína CD33, p.ej., mediante cromatografía de afinidad.

Cualquier característica, etapa, elemento, realización o aspecto de la invención se puede usar combinado con cualquier otro, a menos que se indique específicamente lo contrario. Aunque la presente invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad y comprensión, será evidente que se pueden poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### 25 Ejemplos

##### I. Generación de anticuerpos anti-CD33

##### Materiales

Las líneas celulares descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) (Manassas, VA) o la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), (Braunschweig, Alemania). Las células de LMA primarias se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) que contenía FBS inactivado por calor al 20%, con un suplemento de 25 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleuquina-3 (IL-3) y factor de células madre (SCF). Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen Corp (Carlsbad, CA) y las citocinas se adquirieron de PeproTech (Rocky Hill, NJ).

##### Metodologías:

##### Ensayos de unión de saturación

Se transfirieron cien mil células positivas para CD33 (células HL-60, HEL 92.1.7 y HEK-293F transfectadas para expresar CD33 humana o de cinomolgo) a placas de 96 pocillos. Se añadió mAb para CD33 marcado AlexaFluor-647 a concentraciones que variaban de 50 nM a 0,85 pM y las células se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación, se lavaron 3 veces con una solución de PBS + BSA al 1% y se resuspendieron en 125  $\mu$ L de PBS + BSA al 1%. La fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo, y el porcentaje de señal fluorescente saturada se utilizó para determinar el porcentaje de unión y posteriormente calcular la Kd aparente.

##### 45 Ensayos de unión competitiva

Se transfirieron cien mil células positivas para CD33 a placas de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora sobre hielo con m2H12 marcado con AlexaFluor-647 1 nM y concentraciones crecientes (de 0,03 nM a 600 nM) de mAb 2H12 híbrido, humanizado o quimérico no marcado. Las células se centrifugaron, se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en 125  $\mu$ L de una solución de PBS + BSA al 1%. La fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo, y el porcentaje de señal fluorescente saturada se utilizó para determinar el porcentaje de mAb 2H12 marcado unido. La CE50 se extrapoló ajustando los datos a una curva dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable.

##### Ensayo de citotoxicidad

Las líneas celulares de LMA o las células de LMA primaria se trataron con mAb específico para CD33 y productos

conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) durante 96 horas a 37°C. En algunos experimentos, se incluyeron ADC que no se unían al antígeno como controles negativos. La viabilidad celular para las líneas celulares se midió utilizando CelltiterGlo (Promega Corporation, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 25 minutos a temperatura ambiente con los reactivos CelltiterGlo y se midió la luminiscencia en un lector de placas fluorescentes Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Para las células de LMA primarias, la viabilidad se midió mediante citometría de flujo utilizando anexina V y tinción con yoduro de propidio. Los resultados son referidos como CI50, la concentración de compuesto necesaria para producir una reducción de 50% en la viabilidad en comparación con las células tratadas con vehículo (control = 100%).

#### Producción de productos conjugados de anticuerpo y fármaco

Los productos conjugados de anticuerpo y fármaco de los anticuerpos CD33 se prepararon como se describe en el documento US20050238649 y WO2011/130613 utilizando los anticuerpos anti-CD33 descritos en la presente memoria. El conector de fármaco SGD-1269 (mcMMAF) se describe en el documento US20050238649 y el conector de fármaco SGD-1910 se describe en el documento WO2011/130613. La preparación de mutantes de cisteína de mAb IgG1 se describe generalmente en el documento US20100158909. El conector de fármaco SGD-1269 se conjugó con el anticuerpo anti-CD33 h2H12 a través de un grupo tiol de un resto de cisteína de un enlace disulfuro intercatenario y la carga promedio de fármaco fue de aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. El conector de fármaco SGD-1910 se conjugó con el anticuerpo anti-CD33 a través de un grupo tiol de un resto de cisteína introducido en la posición 239 de la cadena de IgG1 del anticuerpo y la carga promedio de fármaco fue de aproximadamente 2 fármacos por anticuerpo. Los anticuerpos con cisteína en la posición 239 tienen la designación EC, por ejemplo, h2H12EC o h00EC

#### Estudio de actividad *in vivo*

##### Modelo de LMA diseminada

A ratones CB-17/1crHsd-PrkdcSCID (SCID) se les inocularon por vía intravenosa  $5 \times 10^6$  células tumorales HL-60 en la vena de la cola. Un día después de la inoculación del tumor, los ratones ( $n = 8$ /grupo) se dejaron sin tratar o se les administró intraperitonealmente una dosis cada cuatro días para un total de dos dosis con mAb y ADC para CD33 o mAb y ADC de control sin unión. Se incluyó Mylotarg dosificado por vía intraperitoneal cada siete días para un total de dos dosis como control positivo en este modelo de LMA sensible a Mylotarg. Los animales fueron sacrificados cuando la pérdida de peso corporal fue  $\geq 20\%$ , o cuando los ratones mostraron signos de enfermedad diseminada manifestada como síntomas del sistema nervioso central que incluían hinchazón craneal y/o parálisis de los miembros posteriores o desarrollo de una masa tumoral diseminada palpable.

##### Modelos de LMA subcutánea

A ratones SCID se les inocularon por vía subcutánea  $5 \times 10^6$  células tumorales de LMA HL-60 o TF1- $\alpha$ . El crecimiento tumoral se controló con calibradores y el volumen tumoral medio se calculó utilizando la fórmula ( $0,5 \times [\text{longitud} \times \text{ancho}^2]$ ). Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones ( $n = 6-7$ /grupo) se dejaron sin tratar o se les administró una dosis por vía intraperitoneal con una dosis única de ADC para CD33 o ADC de control sin unión. Para el modelo HL-60, los ratones se trataron con IVIg humana (inyección intraperitoneal única de  $10 \text{ mg/kg}$ ) aproximadamente cuatro horas antes de la administración del anticuerpo terapéutico para minimizar la interacción del ADC de prueba con los receptores para Fc en las células LMA. Los ratones se sacrificaron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente  $1000 \text{ mm}^3$ . Todos los procedimientos con animales se realizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en una instalación acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio.

#### Resultados

##### 1. Generación de mAb para CD33 murino

Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD33 humano se generaron en ratones Balb/c por inmunización con proteína de fusión CD33-Fc humana recombinante. El mAb murino 2H12 (m2H12) se seleccionó basándose en la afinidad de unión por CD33 humano y CD33 de cinomólogo para permitir el ensayo preclínico en primates no humanos.

##### 2. Diseño y prueba de anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados se obtuvieron a partir del anticuerpo 2H12 murino. Se elaboraron nueve cadenas pesadas humanizadas (HA-HI) y siete cadenas ligeras humanizadas (LA-LG) incorporando retror mutaciones en diferentes posiciones. Véanse, en las Figuras 1A, B un alineamiento de secuencia y las Tablas 1-4.

**Tabla 1 Mutaciones humanizantes en variantes de cadena pesada**

Variante de V <sub>H</sub>	Secuencia aceptora del exón de V <sub>H</sub>	Restos marco del donador
hV <sub>H</sub> A	VH1-18	Ninguno
hV <sub>H</sub> B	VH1-18	H71
hV <sub>H</sub> C	VH1-18	H94
hV <sub>H</sub> D	VH1-18	H73
hV <sub>H</sub> E	VH1-18	H48
hV <sub>H</sub> F	VH1-18	H38, H40
hV <sub>H</sub> G	VH1-18	H66, H67, H69
hV <sub>H</sub> H	VH1-18	H82A, H83
hV <sub>H</sub> I	VH1-18	H48, H66, H67, H69, H71, H94

**Tabla 2 Mutaciones humanizantes en variantes de cadena ligera**

Variante de V <sub>L</sub>	Secuencia aceptora del exón de V <sub>L</sub>	Restos marco del donador
hV <sub>L</sub> A	VL1-16	Ninguno
hV <sub>L</sub> B	VL1-16	L3
hV <sub>L</sub> C	VL1-16	L46
hV <sub>L</sub> D	VL1-16	L69
hV <sub>L</sub> E	VL1-16	L71
hV <sub>L</sub> F	VL1-16	L20, L22
hV <sub>L</sub> G	VL1-16	L22, L46, L69, L71

5 **Tabla 3 Mutaciones específicas en variantes de cadena pesada de 2H12**

Variante	H38	H40	H48	H66	H67	H69	H71	H73	H82A	H83	H94
HA	R	A	M	R	V	M	T	T	R	R	R
HB	R	A	M	R	V	M	A*	T	R	R	R
HC	R	A	M	R	V	M	T	T	R	R	S*
HD	R	A	M	R	V	M	T	K*	R	R	R
HE	R	A	I*	R	V	M	T	T	R	R	R
HF	N*	R*	M	R	V	M	T	T	R	R	R
HG	R	A	M	K*	A*	L*	T	T	R	R	R
HH	R	A	M	R	V	M	T	T	S*	T*	R
HI	R	A	I*	K*	A*	L*	A*	T	R	R	S*

\*Restos de ratón

**Tabla 4 Mutaciones específicas en variantes de cadena ligera de 2H12**

Variante	L3	L20	L22	L46	L69	L71
LA	Q	T	T	S	T	F
LB	K*	T	T	S	T	F
LC	Q	T	T	T*	T	F



Variante	L3	L20	L22	L46	L69	L71
LD	Q	T	T	S	Q*	F
LE	Q	T	T	S	T	Y*
LF	Q	I*	N*	S	T	F
LG	Q	T	N*	T*	Q*	Y*

\*Restos de ratón

5 Las cadenas pesada y ligera humanizadas se emparejaron con cadenas ligeras y pesadas quiméricas (cadenas quiméricas compuestas por regiones variables murinas y regiones constantes humanas), respectivamente. Las variantes híbridas humanizadas/quiméricas del mAb para CD33 se sometieron a prueba para la unión a CD33 humana expresada sobre la superficie de las células de LMA HEL 92.1.7 (Tabla 5). Las cadenas pesadas HC y HI se seleccionaron para un estudio posterior. Se expresaron anticuerpos humanizados que representaban permutaciones de cadenas pesadas humanizadas HC y HI y cadenas ligeras humanizadas LA, LE y LG y se determinó la unión a células que expresan CD33 humana o de cinomolgo (cino) (Tabla 6). El anticuerpo HILG (2H12 HILG) se seleccionó como el anticuerpo humanizado que más se parecía a las características de unión del mAb para CD33 murino m2H12. El anticuerpo HILG se denomina anticuerpo h2H12 (anticuerpo 2H12 humano). Se determinó la  $K_D$  para m2H12, h2H12 y h2H12 con una mutación S239C (numeración EU) en la cadena pesada de IgG1 (denominada h2H12EC, para la cisteína modificada), para la CD33 humana expresada como una proteína endógena en dos líneas celulares de LMA o como una proteína recombinante en una línea celular HEK293F. La  $K_D$  para estos anticuerpos también se determinó para CD33 de cinomolgo expresada como una proteína recombinante en una línea celular HEK293F (Tabla 7).

**Tabla 5 Determinaciones de unión CE50 para variantes de mAb para CD33 híbrido quimérico-humanizado en células de LMA HEL9217 que expresan CD33**

mAb	CE50 (nM)
m2H12	2,38
c2H12	1,97
cHLA	2,61
cHLB	2,53
cHLC	2,49
cHLD	2,48
cHLE	1,95
cHLF	2,02
cHLG	1,91
HAcL	DNB
HBcL	DNB
HCcL	2,95
HDcL	DNB
HEcL	DNB
HFcL	DNB
HGcL	DNB
HHcL	DNB
HIcL	2,56
HILG	3,39

DNB, no se unía; m, murina; cH, cadena pesada quimérica; cL, cadena ligera quimérica

**Tabla 6 Determinaciones de la unión CE50 para variantes de mAb para CD33 humanizado en células que expresan CD33 humana y CD33 de cinomolgo**

Variante de 2H12	HEL9217	CD33 humana HEK293F	CD33 de cinomolgo HEK293F
	CE50 (nM)	CE50 (nM)	CE50 (nM)
m2H12	5,4	11,6	30,6
HCLA	13,6	31,7	141,4
HCLE	12,8	22,2	129,3
HCLG	7,9	17,9	63
HILA	12,2	26,8	126,4
HILE	11,1	19,3	64,8
HILG	7,8	14,4	39,9

**Tabla 7 Mediciones de afinidad de mAb para CD33 humanizados para células que expresan CD33 humana y de cinomolgo**

	HL-60	HEL9217	hCD33 HEK293F	CD33 de cinomolgo HEK293F
m2H12	0,144	0,170	ND	2,718
h2H12	0,208	0,161	0,958	1,218
h2H12EC	0,253	0,204	1,000	5,128
ND, no realizado				

## Actividad antitumoral in vitro del ADC con h2H12

La actividad citotóxica de los productos conjugados de anticuerpo h2H12-fármaco se sometió a prueba utilizando dos sistemas de conector de fármaco, SGD-1269 (conector de fármaco de auristatina) y SGD-1910 (conector de fármaco de dímero de pirrolobenzodiazepina). Se realizó un ensayo de citotoxicidad frente a dos líneas celulares de LMA positivas para CD33, HL-60 y HEL 92.1.7, utilizando anticuerpo no conjugado, ADC con h2H12 y ADC de control que no se unían a CD33. Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos no conjugados h2H12 y h2H12EC (también denominados h2H12d) no tenían actividad contra ninguna de las líneas celulares. Del mismo modo, los ADC de control que no se unían (h00EC-SGD-1910 y h00-SGD-1269) no eran citotóxicos. En contraste, h2H12EC-SGD-1910 era citotóxico para HL-60 (CI50 ~ 1,6 ng/mL) y HEL 92.1.7 (CI50 -12,9 ng/mL). La actividad de h2H12EC-SGD-1910 fue similar a la de Mylotarg, un producto conjugado de anticuerpo anti-CD33-fármaco dirigido bien descrito, en células HL-60 y más potente cuando se sometió a prueba contra HEL 92.1.7 (una línea celular resistente a múltiples fármacos (MDR)), donde Mylotarg es ineficaz. m2H12-SGD-1269 y h2H12-SGD-1269 fueron activos contra células HL-60 (CI50 de 1,3 ng/mL y 5,3 ng/mL respectivamente) y en menor medida contra HEL 92.1.7 (Figura 2). En experimentos separados, se sometieron a prueba adicionalmente h2H12-SGD-1269 y h2H12EC-SGD-1910 frente a un panel ampliado de líneas celulares de LMA positivas para CD33. Como se muestra en la Tabla 8, h2H12-SGD-1269 fue activo contra 4 de 7 líneas celulares de LMA (CI50 media para líneas celulares sensibles, 72,8 mg/mL), y h2H12EC-SGD-1910 tuvo actividad potente contra 7 de 7 líneas celulares de LMA sometidas a prueba (CI50 media, 20,4 ng/ml). h2H12EC-SGD-1910 fue más potente que Mylotarg, que era activo en 3 de 8 líneas celulares de LMA positivas para CD33. No se observó actividad cuando los ADC se sometieron a prueba contra tres líneas celulares que no tenían su origen en LMA y no expresaban CD33 (Tabla 8). En conjunto, estos datos demuestran que los productos conjugados de anticuerpo h2H12 y h2H12EC y fármaco eligen como diana selectivamente células positivas para CD33 y muestran actividad citotóxica hacia esas células.

**Tabla 8 Actividad in vitro de productos conjugados de h2H12 y fármaco y Mylotarg contra líneas celulares de LMA**

Línea Celular	Tipo de célula	Número de Receptores de CD33 (x10 <sup>3</sup> )	Estado MDR	CI50 (ng/mL)		
				h2H12-SGD-1269	h2H12EC-SGD-1910	Mylotarg
HL-60	AML	17	-	2	1	11
U937	AML	20	+/-	19	22	>1000

Línea Celular	Tipo de célula	Número de Receptores de CD33 (x10 <sup>3</sup> )	Estado MDR	CI50 (ng/mL)		
				h2H12-SGD-1269	h2H12EC-SGD-1910	Mylotarg
MV4-11	AML	18	+/-	0,1	0,1	6
KG-1	AML	23	+	270	3	3
HEL 92.1.7	AML	19	+	>1000	7	>1000
TF-1	AML	6	+	>1000	61	>1000
TF1- $\alpha$	AML	17	+	>1000	49	>1000
Ramos	NHL	0	NT	> 10.000	> 1.000	NT
ES-2	Carcino. Ovario	0	NT	> 10.000	> 1.000	300
SKOV-3	Carcino. Ovario	0	NT	> 10.000	> 5.000	10.000

MDR, resistencia a múltiples fármacos; +, flujo de salida de colorante > 2 veces el fondo, NT, no sometido a prueba

#### Actividad anti-tumoral in vivo de ADC con h2H12

5 La actividad de h2H12-SGD-1269 se sometió a prueba en un modelo en el que la línea celular de LMA HL-60 se introdujo en ratones SCID para iniciar la enfermedad diseminada. Los ratones se trataron al día siguiente con anticuerpo h2H12, anticuerpo de control negativo IVIg no específico, h2H12-SGD-1269, un ADC de control que no se unía (hBU12-SGD-1269) o Mylotarg de acuerdo con los niveles de dosis y el calendario descritos en la Tabla 9. La mediana de supervivencia de los ratones a los que se había inoculado HL-60 aumentó de 22 días en los grupos no tratados o tratados con IVIg humana a 29 días (p = 0,007), 41 días (p = 0,001) y 52 días (p <0,001) en grupos que habían recibido h2H12 (3 mg/kg) y 1 o 3 mg/kg de h2H12-SGD-1269, respectivamente (Tabla 9). h2H12EC-SGD-1269 prolongó la supervivencia de un modo similar al de los ratones que habían recibido dosis de h2H12-SGD-1269 (mediana de supervivencia de 50 y 52 días, respectivamente). Mylotarg también fue activo en este modelo negativo para MDR; más de 50% de los ratones tratados con Mylotarg sobrevivieron hasta el final del estudio el día 99. La supervivencia de los ratones tratados con el anticuerpo h2H12 no conjugado o el ADN de control que no se unía (hBU12-SGD-1269) se prolongó 6-7 días en comparación con los ratones de control no tratados, pero en un grado mucho menor que los ratones tratados con el ADC dirigido a CD33.

**Tabla 9 Actividad del producto conjugado de fármaco con h2H12-SGD-1269 en un modelo de xenoinjerto de LMA diseminada HL-60**

	Nivel de Dosis (mg/kg)	Calendario de Dosis	Mediana de la Supervivencia (Día)	Valor P
No tratado	---	---	22	---
hIVIg	3	Cada 4 días, 2 dosis	22	NS <sup>1</sup>
h2H12	3	Cada 4 días, 2 dosis	29	0,007 <sup>2</sup>
h2H12-SGD-1269	1	Cada 4 días, 2 dosis	41	0,001 <sup>3</sup>
h2H12-SGD-1269	3	Cada 4 días, 2 dosis	52	<0,001 <sup>3</sup>
h2H12EC-SGD-1269	3	Cada 4 días, 2 dosis	50	<0,001 <sup>3</sup>
hBU12-SGD-1269	3	Cada 4 días, 2 dosis	28	<0,001 <sup>2</sup>
Mylotarg	3	Cada 7 días, 2 dosis	NR	<0,001 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Prueba versus no tratado  
<sup>2</sup> Prueba versus hIVIg  
<sup>3</sup> Prueba versus hBU12-SGD-1269 (ADC de control sin unión)  
 NS, no significativo; NR, no alcanzado; ---, no aplicable; hIVIg, inmunoglobulina intravenosa humana; hBU12-SGD-1269, ADC de control sin unión.

20 La actividad de h2H12EC-SGD-1910 se sometió a prueba en dos modelos de xenoinjerto de LMA subcutáneos, HL-60 y TF1- $\alpha$ . A ratones SCID que portaban tumores establecidos (~100 mm<sup>3</sup>) se les administraron dosis de h2H12EC-

5 SGD-1910 o ADC de control sin unión (h00EC-SGD-1910) como se describe en la Tabla 10 para el modelo HL-60 y en la Tabla 11 para el modelo de tumor TF1- $\alpha$ . El tratamiento con h2H12EC-SGD-1910 disminuyó significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los ratones no tratados y tratados con ADC de control sin unión, medido por el tiempo medio necesario para que los tumores cuadruplicaran su volumen (Tablas 10 y 11). La actividad antitumoral observada con CDA dirigido a CD33 fue dependiente de la dosis. Para los tumores HL-60, una sola dosis de 0,1 mg/kg dio como resultado una regresión tumoral completa y duradera en 6 de 6 ratones tratados. Una dosis inferior de 0,03 mg/kg dio como resultado una regresión completa en 1 de 6 ratones tratados y amplió el tiempo hasta que el tumor se cuadruplicó a 20 días en comparación con 15 días para los ratones no tratados y los dosificados de forma similar con el ADC de control sin unión (h00d-SGD-1910). En el modelo de tumor TF1- $\alpha$  positivo para MDR (Tabla 11), una dosis única de 0,3 mg/kg de h2H12EC-SGD-1910 dio como resultado una regresión tumoral completa y duradera en 5 de 7 ratones tratados. La mediana de días hasta cuadruplicar el tumor no se había alcanzado al final del estudio el día 117. Por el contrario, los tumores en ratones que habían recibido dosis de manera similar con el ADN de control sin unión (h00EC-SGD-1910) habían cuadruplicado su volumen en 27 días. Del mismo modo, la mediana del tiempo para que los tumores se cuadruplicaran en ratones que habían recibido dosis de 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg de h2H12EC-SGD-1910 fue significativamente más larga ( $p = 0,0001$ ) que la de ratones no tratados o tratados con h00EC-SGD-1910. Mylotarg no fue activo en el modelo de tumor TF1- $\alpha$ ; el crecimiento tumoral de ratones tratados con Mylotarg no fue diferente del de los ratones no tratados. Tomados en conjunto, los datos demuestran que el ADC con h2H12 muestra actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de LMA que es dependiente de la dosis y significativamente mayor que el del ADC no dirigido.

20 **Tabla 10 Actividad del producto conjugado de fármaco h2H12EC-SGD-1910 en modelo de xenoinjerto de MLA HL-60 subcutáneo**

	Nivel de dosis, Dosis única (mg/kg)	Mediana del tiempo para cuadruplicar (Día)	Valor P: Prueba versus		DCR
			No tratado	ADC Control	
No tratado	---	15	---	---	0/6
hIVIg	10	15	---	---	0/6
h2H12EC-SGD-1910	0,1	NR	0,0005	0,0005	6/6
h2H12EC-SGD-1910	0,03	20	0,0005	0,0016	1/6
h00EC-SGD-1910	0,1	17	0,009	---	0/6
h00EC-SGD-1910	0,03	15	NS	---	0/6

NS, no significativo; NR, no alcanzado; ---, no aplicable; hIVIg, inmunoglobulina intravenosa humana (administrada 4 horas antes de la dosis de ADC); h00EC-SGD-1910, ADC de control sin unión; DCR, respuesta completa duradera (tumor no medible al final del estudio el día 50)

**Tabla 11 Actividad del producto conjugado de fármaco h2H12EC-SGD-1910 en modelo de xenoinjerto de LMA TF1- $\alpha$  subcutáneo**

	Nivel dosis, Dosis única (mg/kg)	Mediana del tiempo para cuadruplicar (Día)	Valor P: Prueba versus		DCR
			No tratado	ADC Control	
No tratado	---	20	---	---	0/7
h2H12EC-SGD-1910	0,3	NR	0,0001	0,0001	5/7
h2H12EC-SGD-1910	0,1	51	0,0001	0,0001	0/7
h2H12EC-SGD-1910	0,03	32	0,0001	0,0001	0/7
h00EC-SGD-1910	0,3	27	0,001	---	0/7
h00EC-SGD-1910	0,1	23	0,03	---	0/7
h00EC-SGD-1910	0,03	22	0,05	---	0/7

	Nivel dosis, Dosis única (mg/kg)	Mediana del tiempo para cuadruplicar (Día)	Valor P: Prueba versus		DCR
			No tratado	ADC Control	
Mylotarg	1	21	NS	---	0/7

NS, no significativo; NR, no alcanzado; ---, no aplicable; h00EC-SGD-1910, ADC de control sin unión; DCR, respuesta completa duradera (tumor no medible al final del estudio el día 117)

**Listado de secuencias**

**SEQ ID NO:1, Cadena ligera 2H12 murina**

DIKMTQSPSSMYASLGERRVINCASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDY  
SLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

**5 SEQ ID NO:2, 2H12 LA**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO:3, 2H12 LB**

DIKMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO:4, 2H12 LC**

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO:5, 2H12 LD**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGQDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO:6, 2H12 LE**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**15 SEQ ID NO:7, 2H12 LF**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVINCASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO:8, 2H12 LG**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVINCASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPS  
RFSGSGSGQDYTLTISSSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO:9 Cadena pesada 2H12 murina**

20 1 QVQLVQSGPE LVRPGTFVKI SCKASGYTFT NYDINWVNQR PGQGLEWIGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKAKATL TADKSSSTAY LQLNLTSEN SAVYFCASGY EDAMDYWGQG TSVTVSS

**SEQ ID NO:10 2H12 HA**

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TTDSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

**SEQ ID NO:11 2H12 HB**

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TADTSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

**25 SEQ ID NO:12 2H12 HC**

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TTDSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

**SEQ ID NO:13 2H12 HD**

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TDKSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

**SEQ ID NO:14 2H12 HE**

30 1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWIGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TTDSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

**SEQ ID NO:15 2H12 HF**

# ES 2 686 618 T3

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVNQR PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

## SEQ ID NO:16 2H12 HG

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKAKATL TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

## SEQ ID NO:17 2H12 HH

5 1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWMGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKARVTM TTDSTSTAY MELSSLTSDD TAVYYCARGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

## SEQ ID NO:18 2H12 HI

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYDINWVRQA PGQGLEWIGW IYPGDGSTKY  
61 NEKFKAKATL TADTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCASGY EDAMDYWGQG TTVTVSS

## SEQ ID NO:19 CDR1 de cadena pesada de 2H12 NYDIN

10 SEQ ID NO:20 CDR2 de cadena pesada de 2H12  
WIYPGDGSTKYNEKFKA

## SEQ ID NO:21 CDR3 de cadena pesada de 2H12 GYEDAMDY

15 SEQ ID NO:22 CDR1 de cadena ligera de 2H12  
KASQDINSYLS

## SEQ ID NO:23 CDR2 de cadena ligera de 2H12 RANRLVD

## SEQ ID NO:24 CDR3 de cadena ligera de 2H12 LQYDEFPLT

20 SEQ ID NO:25<Región constante de cadena ligera;PRT/1;homo sapiens>  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## SEQ ID NO:26<CH1-CH3;PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK

## SEQ ID NO:27<CH1 - CH3 de cadena pesada (K no c-terminal);PRT/1;homo sapiens>

25 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG

## SEQ ID NO:28<S239C CH1 - CH3 de cadena pesada;PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPCVFLFPPKPKDTLMIISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK

30 SEQ ID NO:29<S239C CH1 - CH3 de cadena pesada (K no c-terminal);PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPCVFLFPPKPKDTLMIISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG

## SEQ ID NO:30 <líder de cadena ligera de mAb h2H12 > MDMRTPAQFLGILLWFGPIKC

## SEQ ID NO:31<líder de cadena pesada de mAb h2H12 >

MGWRWIFLFLLSGTAGVHC

SEQ ID NO:32 > 2H12 LA

gacatccagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggacagatttc  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

SEQ ID NO:33 > 2H12 LB

gacatcaagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggacagatttc  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

5

SEQ ID NO:34 > 2H12 LC

gacatccagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggacagatttc  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

SEQ ID NO:35 > 2H12 LD

gacatccagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggcaagatttc  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

10

SEQ ID NO:36 > 2H12 LE

gacatccagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggacagattat  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

SEQ ID NO:37 > 2H12 LF

gacatccagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcattatcaattgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggacagatttc  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

15

SEQ ID NO:38 > 2H12 LG

gacatccagatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcaattgtaa  
ggctagt caggacattaatagctat tttgagctgggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctga  
tctatagagcaaatagattggtagatgggtcccataagggtctctggcagtgatctgggcaagattat  
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat tttgcaacttattactgcttgagatgatgagttcc  
tctcacat tttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa

SEQ ID NO:39 > 2H12 HA

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggtagtaccaaataatgagaaattcaaggccagagtcaccatgacc  
acagacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgatta  
ctgtgctagaggatataagatgctatggactactggggcaagggaaccacagtcacagctcctca

20

SEQ ID NO:40 > 2H12 HB

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggtagtaccaaataatgagaaattcaaggccagagtcaccatgaca  
gctgacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgatta  
ctgtgctagaggatataagatgctatggactactggggcaagggaaccacagtcacagctcctca

SEQ ID NO:41 > 2H12 HC

## ES 2 686 618 T3

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccagagtaccatgacc  
acagacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgcttctggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

### SEQ ID NO:42 > 2H12 HD

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccagagtaccatgacc  
acagacaagtccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgctagaggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

### SEQ ID NO:43 > 2H12 HE

Caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
ttggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccagagtaccatgacc  
acagacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgctagaggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

5

### SEQ ID NO:44> 2H12 HF

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgaaccagaggcctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccagagtaccatgacc  
acagacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgctagaggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

10

### SEQ ID NO:45 > 2H12 HG

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccaaggctaccctgacc  
acagacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgctagaggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

### SEQ ID NO:46 > 2H12 HH

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
tgggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccagagtaccatgacc  
acagacacatccaccagcacagcctacatggagctgagcagcctgacctctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgctagaggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

### SEQ ID NO:47 > 2H12 HI

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggc  
ttctggttacacctttaccaattatgatataaattgggtgagacaggcccctggacaagggttgagtgga  
ttggatggatttatcctggagatggttagtaccaaatataatgagaaattcaaggccaaggctaccctgaca  
gctgacacatccaccagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgatgacacagctgtgtatta  
ctgtgcttctggatatagaagatgctatggactactggggcaagggaccacagtcacagtcctctca

15

### SEQ ID NO:48<región constante de cadena ligera;ADN; homo sapiens>

acggtggctgcaccatctgtcttcatctcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgt  
tgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtagtggaagggtgataacgccctccaat  
cgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctg  
acgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaagctcagcctgcgaagtcacccatcaggcctgagctc  
gcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

### SEQ ID NO:49<CH1-CH3;ADN;homo sapiens>



gctagcaccgaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagctgc  
cctgggctgcctggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgacca  
gcgcgctgcacaccttccccgctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctg  
ccctccagcagcttgggacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga  
caagaaagttgagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctgg  
ggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtc  
acatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga  
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaacaagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctca  
ccgtcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc  
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc  
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg  
ccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac  
ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
ctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggtaa

SEQ ID NO:50<CH1-CH3 (K sin c-terminal);ADN;homo sapiens>

gctagcaccgaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagctgc  
cctgggctgcctggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgacca  
gcgcgctgcacaccttccccgctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctg  
ccctccagcagcttgggacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga  
caagaaagttgagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctgg  
ggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtc  
acatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga  
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaacaagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctca  
ccgtcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc

cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc  
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg  
ccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac  
ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
ctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggt

5

SEQ ID NO:51<S239C CH1-CH3;ADN;artificial>

gctagcaccgaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagctgc  
cctgggctgcctggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgacca  
gcgcgctgcacaccttccccgctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctg  
ccctccagcagcttgggacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga  
caagaaagttgagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctgg  
ggggaccgtgtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtc  
acatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga  
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaacaagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctca  
ccgtcctgcaccaggtggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc  
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc  
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg  
ccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac  
ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
ctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggtaa

SEQ ID NO:52<S239C CH1-CH3 (K sin c-terminal);ADN;artificial>

Gctagcaccgaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagctgc  
cctgggctgcctggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgacca  
gcgcgctgcacaccttccccgctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctg  
ccctccagcagcttgggacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga  
caagaaagttgagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctgg  
ggggaccgtgtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtc  
acatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga  
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaacaagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctca  
ccgtcctgcaccaggtggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc  
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc  
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcg  
ccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac  
ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
ctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggt

10 SEQ ID NO:53 <líder de cadena ligera de mAb de h2H12 >  
Atggacatgaggaccctgctcagtttctggaatctgtgctctggttccaggatcaaatgt

SEQ ID NO:54 <líder de cadena pesada de mAb h2H12 >  
Atgggatggagatggtatcttcttctcctctcggaactgcaggtgtccattg

SEQ ID NO:55 proteína P20138 CD33, homo sapiens

1 mp11111p11 wagalamdpn fwlqvqesvt vqeglcvlvp ctffhpiipy dknspvhgyw  
 61 fregaiisrd spvatnkldq evqeetqgrf rllgdpsrnn cslsivdarr rdngsyffrm  
 121 ergstkysyk spqlsvhvtd lthrpkilip gtlepghskn ltcsvswace qgtppifswl  
 181 saaptslgpr tthssvliit prpqdhgtnl tcqvkfagag vttertiqln vtyvpqnppt  
 241 gifpgdgsqk qetravvvhg aiggagvtal lalclcliff ivkthrrkaa rtavgrndth  
 301 pttgsaspkh qkksklhgpt etsscsgaap tvemdeelhy aslnfhgmnp skdtsteyse  
 361 vrtq

SEQ ID NO:56 proteína CD33, cinomolgo

mp1111p11wagalamdprvrlevqesvtvqeglcvlvpctffhvpvyhtrnspvhgywfregaiivslDSP  
 vatnkldqevqeetqgrfrllgdpsrnnncslsivdarrndngsyffrmekgstkysykstqlsvhvtdlth

5

rpqilipgaldpdhsknltsvwpwaceqgtppifswmsaaptslglrtthssvliitprpqdhgtnltcqv  
 kfpagvtttertiqlnvsvyasnprtdiflqdgsgkqgvvqgaiggagvtvllalclcliffvkthrrka  
 artavgridthpatgptsskhqkksklhgatetsgcsgttltvemdeelhyaslnfhgmnpseststeyse  
 vrtq

SEQ ID NO:57 proteína CD33, cinomolgo

mp1111p11wagalamdprvrlevqesvtvqeglcvlvpctffhvpvyharnspvhgywfregaiivslDSP  
 vatnkldqevreetqgrfrllgdpsrnnncslsivdarrndngsyffrmekgstkysykstqlsvhvtdlth  
 rpqilipgaldpdhsknltsvwpwaceqgtppifswmsaaptslglrtthssvliitprpqdhgtnltcqv  
 kfpagvtttertiqlnvsvyasnprtdiflqdgsgkqgvvqgaiggagvtvllalclcliffvkthrrka  
 artavgridthpatgptsskhqkksklhgatetsgcsgttltvemdeelhyaslnfhgmnpseststeyse  
 vrtq

10 **Listado de secuencias**

<110> Sutherland, May Kung Ryan, Maureen Sussman, Django Burke, Patrick Jeffrey, Scott

<120> Anticuerpos anti-CD33 y uso de los mismos para tratar cáncer

<130> 057762/431172

<140> 13/804,227

15 <141> 2013-03-14

<150> 61/649,110

<151> 2012-05-18

<160> 57

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20 <210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

25

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 686 618 T3

<220>

<223> Sintética

<400> 2

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

5

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

<400> 3

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

15

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

20

<400> 4

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

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 5

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

5

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

<400> 6

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

15

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

20

<400> 7

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

<210> 8

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Sintética

<400> 8  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 9  
 <211> 117  
 10 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 9  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Asn Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Asn Leu Thr Ser Glu Asn Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10  
 15 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

20 <400> 10  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

ES 2 686 618 T3

<210> 11  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintética

<400> 11  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 <210> 12  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

15 <400> 12  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

20 <210> 13  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

25 <400> 13

ES 2 686 618 T3

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

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 14

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

10

115

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 15

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

20

<210> 16

ES 2 686 618 T3

<211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintética

<400> 16  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 <210> 17  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

<400> 17  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 18  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 18



ES 2 686 618 T3

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

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 19

Asn Tyr Asp Ile Asn  
 1 5

<210> 20

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Ala

<210> 21

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5

20 <210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

25 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser  
 1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 23

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp  
 1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Mus musculus

<400> 24

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr  
 1 5

ES 2 686 618 T3

<210> 25  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 25  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

10 <210> 26  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

ES 2 686 618 T3

<210> 27  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 27  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

10 <210> 28  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

15 <400> 28  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

ES 2 686 618 T3

```

                85                90                95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                100                105                110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
                115                120                125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                130                135                140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                150                155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                170                175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                180                185                190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                195                200                205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                210                215                220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                230                235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                250                255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                260                265                270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                275                280                285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                290                295                300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                310                315                320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                330

```

<210> 29

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 29

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1                5                10                15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                20                25                30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                35                40                45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50                55                60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                70                75                80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                90                95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                100                105                110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
                115                120                125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130                135                140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                150                155                160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

```

10

ES 2 686 618 T3

```

                165                170                175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                180                185                190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                195                200                205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                210                215                220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                230                235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                250                255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                260                265                270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                275                280                285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                290                295                300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                310                315                320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                325

```

<210> 30

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 30

```

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15
Phe Pro Gly Ile Lys Cys
                20

```

10 <210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 31

```

Met Gly Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1          5          10          15
Val His Cys

```

<210> 32

<211> 321

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 32

25 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

```

atcacttgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120
gggaaaagccc ctaagtccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttctctg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgcttgacag tatgatgagt ttcctctcac atttggagga 300
gggaccaagg tggagatcaa a                                     321

```

<210> 33

<211> 321

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 33

```
gacatcaaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttctctg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgcttgagc tatgatgagt ttcctctcac atttggagga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

5 <210> 34

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 34

```
gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagaccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttctctg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgcttgagc tatgatgagt ttcctctcac atttggagga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 35

<211> 321

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 35

```
gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttctctg gcagtggatc tgggcaagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgcttgagc tatgatgagt ttcctctcac atttggagga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

20 <210> 36

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 36

```
gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180
aggttctctg gcagtggatc tgggacagat tatactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgcttgagc tatgatgagt ttcctctcac atttggagga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 37

30 <211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

35 <400> 37

ES 2 686 618 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcatt 60  
 atcaattgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagtccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180  
 aggttctctg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatttg caacttatta ctgcttgca g tatgatgagt ttctctcac atttggagga 300  
 gggaccaag a tggagatcaa a 321

<210> 38  
 <211> 321  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 38  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcaattgta aggctagtca ggacattaat agctatttga gctggtttca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagaccct gatctataga gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180  
 aggttctctg gcagtggatc tgggcaagat tatactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatttg caacttatta ctgcttgca g tatgatgagt ttctctcac atttggagga 300  
 gggaccaag a tggagatcaa a 321

10 <210> 39  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 39  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atttatcctg gagatgtag taccaaatat 180  
 aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg accacagaca catccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300  
 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

20 <210> 40  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

<400> 40  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atttatcctg gagatgtag taccaaatat 180  
 aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg acagctgaca catccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300  
 25 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

<210> 41  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 41  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atttatcctg gagatgtag taccaaatat 180  
 aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg accacagaca catccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc ttctggatat 300  
 30 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

ES 2 686 618 T3

<210> 42  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintético

<400> 42  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta caccttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg gagatggtag taccaaata 180  
 aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg accacagaca agtccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300  
 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

<210> 43  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 43  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta caccttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gattggatgg atttatcctg gagatggtag taccaaata 180  
 aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg accacagaca catccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300  
 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

<210> 44  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

<400> 44  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta caccttacc aattatgata taaattgggt gaaccagagg 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg gagatggtag taccaaata 180  
 aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg accacagaca catccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300  
 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

<210> 45  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintético

<400> 45  
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta caccttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg gagatggtag taccaaata 180  
 aatgagaaat tcaaggccaa ggctaccctg accacagaca catccaccag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300  
 gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351

<210> 46  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>



ES 2 686 618 T3

<223> Sintético

<400> 46

```
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta caccttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attatcctg gagatgtag taccaaatat 180
aatgagaaat tcaaggccag agtcaccatg accacagaca catccaccag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgac ctctgatgac acagctgtgt attactgtgc tagaggatat 300
gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351
```

<210> 47

5 <211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 47

```
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta caccttacc aattatgata taaattgggt gagacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gattggatgg attatcctg gagatgtag taccaaatat 180
aatgagaaat tcaaggccaa ggctaccctg acagctgaca catccaccag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc ttctggatat 300
gaagatgcta tggactactg ggggcaaggg accacagtca cagtctcctc a 351
```

<210> 48

<211> 318

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 48

```
acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aagtgagata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaagtct acgctgagca agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgt 318
```

<210> 49

<211> 990

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

```
gctagcacca agggcccac tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagctt tcctcttccc ccaaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660
aaagccaaag ggcagcccag agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990
```

<210> 50

25 <211> 987

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 50

ES 2 686 618 T3

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc cgggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc cgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 987

<210> 51

<211> 990

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 51

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtgtgtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc cgggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc cgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

10 <210> 52

<211> 987

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 52

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtgtgtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc cgggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc cgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 987

# ES 2 686 618 T3

<210> 53  
<211> 66  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Sintético

<400> 53  
atggacatga ggaccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc 60  
aatgt 66

10 <210> 54  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintético

15 <400> 54  
atgggatgga gatgatctt tctttcctc ctgctgggaa ctgcagggtg ccattgc 57

<210> 55  
<211> 364  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens

<400> 55

ES 2 686 618 T3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln  
 20 25 30  
 Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly  
 50 55 60  
 Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro  
 85 90 95  
 Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Asp  
 100 105 110  
 Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser  
 115 120 125  
 Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg  
 130 135 140  
 Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile  
 165 170 175  
 Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr  
 180 185 190  
 His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr  
 195 200 205  
 Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu  
 210 215 220  
 Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly  
 245 250 255  
 Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala  
 260 265 270  
 Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys  
 275 280 285  
 Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly  
 290 295 300  
 Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu  
 325 330 335  
 Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys  
 340 345 350  
 Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln  
 355 360

<210> 56

<211> 359

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 56

ES 2 686 618 T3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala Met  
 1 5 10 15  
 Asp Pro Arg Val Arg Leu Glu Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu  
 20 25 30  
 Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Val Pro Tyr  
 35 40 45  
 His Thr Arg Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala  
 50 55 60  
 Ile Val Ser Leu Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu  
 65 70 75 80  
 Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser  
 85 90 95  
 Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn  
 100 105 110  
 Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Lys Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr  
 115 120 125  
 Lys Ser Thr Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro  
 130 135 140  
 Gln Ile Leu Ile Pro Gly Ala Leu Asp Pro Asp His Ser Lys Asn Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe  
 165 170 175  
 Ser Trp Met Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Leu Arg Thr Thr His  
 180 185 190  
 Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn  
 195 200 205  
 Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Pro Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg  
 210 215 220  
 Thr Ile Gln Leu Asn Val Ser Tyr Ala Ser Gln Asn Pro Arg Thr Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Phe Leu Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Gly Val Val Gln Gly Ala  
 245 250 255  
 Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Val Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu  
 260 265 270  
 Ile Phe Phe Thr Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala  
 275 280 285  
 Val Gly Arg Ile Asp Thr His Pro Ala Thr Gly Pro Thr Ser Ser Lys  
 290 295 300  
 His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Ala Thr Glu Thr Ser Gly Cys  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Thr Thr Leu Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala  
 325 330 335  
 Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Glu Asp Thr Ser Thr Glu  
 340 345 350  
 Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln  
 355

<210> 57

<211> 359

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 57

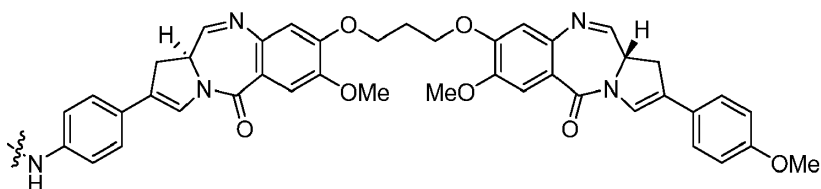
Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala Met  
 1 5 10 15  
 Asp Pro Arg Val Arg Leu Glu Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu  
 20 25 30  
 Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Val Pro Tyr  
 35 40 45

ES 2 686 618 T3

His Ala Arg Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala  
 50 55 60  
 Ile Val Ser Leu Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu  
 65 70 75 80  
 Val Arg Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser  
 85 90 95  
 Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn  
 100 105 110  
 Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Lys Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr  
 115 120 125  
 Lys Ser Thr Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro  
 130 135 140  
 Gln Ile Leu Ile Pro Gly Ala Leu Asp Pro Asp His Ser Lys Asn Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe  
 165 170 175  
 Ser Trp Met Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Leu Arg Thr Thr His  
 180 185 190  
 Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn  
 195 200 205  
 Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Pro Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg  
 210 215 220  
 Thr Ile Gln Leu Asn Val Ser Tyr Ala Ser Gln Asn Pro Arg Thr Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Phe Leu Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Gly Val Val Gln Gly Ala  
 245 250 255  
 Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Val Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu  
 260 265 270  
 Ile Phe Phe Thr Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala  
 275 280 285  
 Val Gly Arg Ile Asp Thr His Pro Ala Thr Gly Pro Thr Ser Ser Lys  
 290 295 300  
 His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Ala Thr Glu Thr Ser Gly Cys  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Thr Thr Leu Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala  
 325 330 335  
 Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Glu Asp Thr Ser Thr Glu  
 340 345 350  
 Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln  
 355

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CD33 humana, en donde el anticuerpo comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR): CDR1 de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 19, CDR2 de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 20 y CDR3 de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 21; y tres CDR de cadena ligera: CDR1 de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 22, CDR2 de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 23, y CDR3 de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 24.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se selecciona entre un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% a SEQ ID NO: 18, siempre que la posición H48 esté ocupada por I, la posición H66 esté ocupada por K, la posición H67 esté ocupada por A, la posición H69 esté ocupada por L, la posición H71 esté ocupada por A, y la posición H94 esté ocupada por S y una región variable de cadena ligera madura idéntica en al menos 90% a SEQ ID NO: 8 siempre que la posición L22 esté ocupada por N, la posición L46 esté ocupada por T, la posición L69 esté ocupada por Q y la posición L71 por Y, como se determina mediante el sistema de numeración de Kabat.
5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 95% a SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera madura idéntica en al menos 95% a SEQ ID NO: 8.
6. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, en donde la región variable de cadena pesada madura está fusionada a una región constante de la cadena pesada y la región variable de cadena ligera madura está fusionada a una región constante de la cadena ligera, opcionalmente en donde la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural que presenta una reducción de la unión a un receptor para Fcγ con respecto a la región constante humana natural.
7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2, en donde la región constante de la cadena pesada es de isotipo IgG1, opcionalmente, en donde la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 27 y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 25, o en donde la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 29 (S239C) y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 25.
8. Anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, en donde la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos denominada SEQ ID NO: 18 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos denominada SEQ ID NO: 8.
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.
10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde el agente citotóxico está conjugado con el anticuerpo a través de un conector escindible por enzimas.
11. El anticuerpo de la reivindicación 9 o 10, en donde el agente citotóxico es un ligando de fijación al surco menor del ADN.
12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el agente citotóxico tiene la fórmula



13. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene o está en riesgo de tener un cáncer.
14. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), un trastorno mieloproliferativo crónico, leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (LLA-preB), leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras (LLA-preT), mieloma

múltiple (MM), enfermedad de mastocitos o sarcoma mielóide.

15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado o quimérico de la reivindicación 1.

16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 12.



FIGURA 1A

```

          10      20      30      40      50
2H12 HA  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWMGWIIYPGDGSTKY
2H12 HB  .....
2H12 HC  .....
2H12 HD  .....
2H12 HE  .....I.....
2H12 HF  .....N.R.....
2H12 HG  .....
2H12 HH  .....
2H12 HI  .....I.....
m2H12 H  ...Q...P.LVR..TF..I.....N.R.....I.....
CDR          *****
          60      70      80      90     100     110
2H12 HA  NEKFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYEDAMDYWGQGTIVTVSS
2H12 HB  .....A.....
2H12 HC  .....S.....
2H12 HD  .....K.....
2H12 HE  .....
2H12 HF  .....
2H12 HG  ....K.A.L.....
2H12 HH  .....S..T.....
2H12 HI  ....K.A.L.A.....S.....
m2H12 H  ....K.A.L.A.K.S...LQ.NN.T.ENS...F..S.....S.....
CDR          *****

```

FIGURA 1B

```

          10      20      30      40      50      60
2H12 LA  DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDINSYLSWVQKPKGKAPKSLIYRANRLVDGVPS
2H12 LB  ..K.....
2H12 LC  .....T.....
2H12 LD  .....
2H12 LE  .....
2H12 LF  .....I.N.....
2H12 LG  .....N.....T.....
m2H12 L  ..K.....MY..L.E..I.N.....S..T.....
CDR          *****
          70      80      90     100
2H12 LA  RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTPEGGKVEIKR
2H12 LB  .....
2H12 LC  .....
2H12 LD  .....Q.....
2H12 LE  .....Y.....
2H12 LF  .....
2H12 LG  .....Q.Y.....
m2H12 L  .....Q.YS.....EY..MGI.....A...L.L...
CDR          *****

```

FIGURA 2

