



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 300 122**

⑯ Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **98912977 .0**

⑯ Fecha de presentación : **19.03.1998**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0970227**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2000**

⑯ Título: **Anticuerpos recombinantes e inmunoconjugados dirigidos contra células y tumores portadores de CD-22.**

⑯ Prioridad: **20.03.1997 US 41437 P**

⑯ Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA as represented by THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**
6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, Maryland 20852-3804, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

⑯ Inventor/es: **Fitzgerald, David;**
Pastan, Ira;
Mansfield, Elizabeth y
Kreitman, Robert

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

⑯ Agente: **Ungría López, Javier**

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos recombinantes e inmunoconjugados dirigidos contra células y tumores portadores de CD-22.

5 **Campo técnico**

La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD22, inmunoconjugados anti-CD22, métodos de ensayo de CD22 y métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CD22.

10 **Antecedentes de la invención**

Leucemias y linfomas son dianas atractivas para el tratamiento con inmunotoxinas. La respuesta de pacientes con malignidades de células B se ha investigado ampliamente en ensayos clínicos de fase I/II de actividad de inmunotoxinas. Amlot *et al.*, (1993), Blood 82, 2624-2633; Sausville *et al.*, (1995) Blood 85, 3457-3465; Grossbard *et al* (1993) Blood 81, 2263-2271; Grossbard *et al* (1993) Clin. Oncol. 11, 726-737. Hasta la fecha, se han observado algunas respuestas antitumorales pero la toxicidad mediada por inmunotoxinas para el tejido normal a menudo impedía aumentos de la dosis hasta niveles terapéuticos. Varios antígenos específicos de células B, tales como CD19, CD22 y CD40 son el objetivo de inmunotoxinas preparadas con toxinas vegetales tales como la cadena A de ricina y toxinas bacterianas, tales como la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE). Uckun *et al.*, (1992), Blood 79, 2201-2214; Ghetie *et al.*, (1991), Cancer Res. 51, 5876-5880; Francisco *et al.*, (1995), Cancer Res. 55, 3099-3104.

20 CD22, un antígeno de células B restringido a linaje, que pertenece a la superfamilia de Ig, se expresa en la superficie de muchos tipos de células B malignas, incluyendo células B linfocíticas crónicas (B-CLL), células B de linfoma tales como linfoma de Burkitt y leucemias de células capilares, así como en linfocitos B maduros normales. CD22 no está presente en la superficie celular en etapas tempranas del desarrollo de células B y no se expresa en células madre. Vaickus *et al.*, (1991), Crit. Rev. Oncol/Hematol. 11, 267-297. Adicionalmente, no puede detectarse antígeno esparcido en suero humano normal o en suero de pacientes con CLL. U *et al.*, (1989). Cell. Immunol. 118, 85-99.

30 RFB4 IgG es un anticuerpo monoclonal anti-CD22. Este anticuerpo se ha conjugado químicamente con ricina y exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) y ha mostrado actividad contra células B *in vitro* e *in vivo*; Ghetie *et al.*, (1991). Cancer Res. 51, 5876-5880; Ghetie *et al.*, (1991). Cancer Res. 48, 2610-2617. RFB4 es altamente específico para células del linaje B y no tiene reactividad cruzada detectable con ningún otro tipo celular normal. Li *et al.*, (1989), Cell. Immunol. 118, 85-99. RFB4 IgG ha sido previamente acoplado covalentemente a la cadena A de ricina y a una forma truncada de PE llamada PE35. Estas moléculas conjugadas eran eficaces contra modelos experimentales de xenoinjerto de linfoma y, en el entorno clínico, la inmunotoxina basada en ricina también mostró algo de eficacia contra enfermedad humana. Amlot *et al.*, (1993), Blood 82, 2624-2633; Sausville, (1995), Blood 85, 3457-3465.

40 Aunque los conjugados químicos son frecuentemente muy estables y potentes, son grandes y presumiblemente heterogéneos en sus sitios de enlace, lo que puede dar como resultado una actividad sub-óptima. Los requisitos para preparar grandes cantidades de IgG y la conjugación química también plantean algunas limitaciones sobre la capacidad para fabricar el fármaco. Debido a que la capacidad de penetrar tumores es inversamente proporcional al tamaño de la molécula penetradora, el gran tamaño de los conjugados anticuerpo-toxina puede alterar su capacidad para penetrar masas tumorales tales como las descubiertas en linfomas.

45 **Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención se refiere a inmunoconjugados recombinantes y a los componentes de anticuerpo que sorprendentemente son muy estables y potentes contra células portadoras del antígeno CD22, más típicamente células B malignas. El inmunoconjuguado comprende un agente terapéutico o un péptido marcador detectable unido a un anticuerpo recombinante anti-CD22 estabilizado con disulfuro a través de una cisteína situada en la posición del aminoácido 44 de la V_H y una cisteína en la posición del aminoácido 100 de la V_L y se define en la reivindicación 1. El agente terapéutico puede ser una toxina tal como una exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o un fragmento citotóxico de la misma (por ejemplo PE38). El anticuerpo anti-CD22 es un fragmento de unión de RFB4 que comprende una cadena pesada variable (V_H) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 2, codificada por la SEC ID Nº 1 y una cadena ligera variable (V_L) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 4, codificada por la SEC ID Nº 3 (véase también la Figura 1). La cadena pesada variable puede unirse mediante un enlace peptídico al extremo carboxilo de la toxina. Opcionalmente, la cadena V_H se une mediante un enlace peptídico a la cadena V_L a través de un péptido enlazador tal como el péptido enlazador de la SEC ID Nº 5. En algunas realizaciones, la cadena V_H se une a la cadena V_L a través de un puente disulfuro cisteína-cisteína.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una casete de expresión (véase la reivindicación 10) que codifica el inmunoconjuguado recombinante y a una célula hospedadora que comprende una casete de expresión que codifica los inmunoconjugados recombinantes. El anticuerpo anti-CD22 comprende una cadena pesada variable (V_H) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 2 y una cadena ligera variable (V_L) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 4.

65 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula B maligna (véase la reivindicación 15). El método comprende las etapas de poner en contacto la célula B maligna con una cantidad eficaz de un inmunoconjuguado recombinante que comprende un péptido toxina unido a un anticuerpo anti-CD22. La toxina puede ser una exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o un fragmento citotóxico de la misma tal como PE38.

ES 2 300 122 T3

En algunas realizaciones, la célula B maligna se pone en contacto con el inmunoconjungado *in vivo*. La célula B maligna puede ser una célula B de roedor, una célula B canina o una célula B de primate (por ejemplo célula B humana).

La presente invención prevé un fragmento Fv anti-CD22 que comprende una cadena pesada variable (V_H) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 2 y una cadena ligera variable (V_L) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 4. El fragmento Fv puede ser un fragmento dsFv. En algunas realizaciones, el fragmento Fv está marcado de forma detectable, en otras el fragmento Fv está conjugado a un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser una exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o un fragmento citotóxico de la misma.

La presente invención puede usarse en un método para detectar la presencia de proteína CD22 en una muestra biológica. El método comprende la etapa de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD22 que comprende una cadena pesada variable (V_H) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 2 y una cadena ligera variable (V_L) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 4 y permitir que el anticuerpo se una a la proteína CD22 en condiciones inmunológicamente reactivas, en el que la detección del anticuerpo unido indica la presencia de la proteína CD22. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento dsFv. El anticuerpo empleado en el método puede estar marcado de forma detectable. En algunas realizaciones, el método se realiza *in vivo* en un mamífero.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de las cadenas ligera (SEC ID Nº 4; nucleótidos = SEC ID Nº 3) y pesada (SEC ID Nº 2; nucleótidos = SEC ID Nº 1) de RFB4. Los aminoácidos mostrados en negrita se determinaron mediante el análisis de secuencia de proteína N-terminal.

Figura 2A: Construcción del plásmido (pEM9) que codifica una inmunotoxina de cadena sencilla constituida por las cadenas ligera y pesada variables de RFB4 fusionadas con PE38.

Figura 2B: Construcción de los plásmidos pEM15 y pEM16 que codifican la cadena ligera variable cys100 y la cadena pesada variable cys₄₄ de RFB4 fusionadas a PE38.

Figura 3: citotoxicidad de RFB4(dsFv)PE38 para diversas líneas celulares después de 24 horas de incubación. La incorporación de [³H]leucina se expresa como porcentaje de cpm incorporado por células de control incubadas sin inmunotoxina. *Círculos abiertos* CA46; *triángulos abiertos*, JD-38; *cruces* Raji; *cuadros sólidos* Namalwa; *círculos sólidos* Daudi; *triángulos sólidos* HUT102.

Figura 4: La actividad de unión relativa de inmunotoxinas de RFB4 en comparación con anticuerpo nativo en células CA46. Se usaron anticuerpo completo e inmunotoxinas recombinantes para competir por la unión de cantidades traza de RFB4 IgG marcada con ¹²⁵I. Los recuentos con competencia se expresan como un porcentaje de recuentos de células que se incubaron sin ningún competidor. *Cuadros abiertos* RFB4 IgG; *círculos sólidos* RFB4(scFv)PE38; *triángulos sólidos* RFB4(dsFv)PE38.

Figura 5: Estabilidad de RFB4(dsFv)PE38. Se incubó RFB4(dsFv)PE38 a 37°C durante el número de días indicado y se comparó la citotoxicidad con una muestra que no se incubó a 37°C. *Círculos abiertos*: 7 días; *triángulos abiertos* 5 días; *círculos sólidos* 3 días; *triángulos sólidos* 1 día; *cuadros sólidos* 0 días.

Figura 6A: Actividad anti-aceptación del tumor de RFB4(dsFv)PE38. A ratones desnudos atípicos irradiados el día 4, se les inocularon 5 x 10⁸ células CA46 el día 0. Comenzando el día 1, se administraron inyecciones de 5, 3 ó 1 µg de RFB4(dsFv)PE38 o PBS/diluyente BSA al 0,2% cada día para cuatro dosis. El crecimiento del tumor se controló midiendo el volumen del tumor y se expresa como el volumen medio del tumor de cada grupo. *Cuadros abiertos* 5 µg; *triángulos sólidos* 3 µg; *círculos abiertos* 1 µg; *cuadros sólidos* control de PBS/diluyente BSA al 0,2%.

Figura 6B: Actividad anti-aceptación del tumor de RFB4(dsFv)PE38. A ratones desnudos atípicos irradiados el día 3 se les inocularon 10⁷ células CA46 el día 0. Comenzando el día 1, se administraron inyecciones de 5, 2 ó 1 µg de RFB4(dsFv)PE38 o PBS/diluyente BSA al 0,2% cada día para cuatro dosis. El crecimiento del tumor se controló midiendo el volumen del tumor y se expresa como el volumen medio del tumor de cada grupo. *Cuadros abiertos* 5 µg; *triángulos sólidos* 2 µg; *círculos abiertos* 1 µg; *cuadros sólidos* control de PBS/diluyente BSA al 0,2%.

Figura 7A: Actividad antitumoral de RFB4(dsFv)PE38 contra tumores de CA46. Los ratones desnudos atípicos se irradiaron el día 3 y se les inocularon 10⁷ células CA46 el día 0. Comenzando el día 4, los ratones con tamaños de tumor medios de 50 mm³ se trataron con 8, 5 ó 3 µg de RFB4(dsFv)PE38 o con PBS/diluyente BSA al 0,2% cada dos días para tres dosis. El tamaño del tumor se controló midiendo el volumen del tumor y se expresa como el volumen medio del tumor de cada grupo. 3/5 de los ratones que recibían 8 µg de RFB4(dsFv)PE38 murieron durante el tratamiento y 1/5 de los que recibían 5 µg murieron. *Cuadros abiertos* 8 µg; *triángulos sólidos* 5 µg; *círculos abiertos* 3 µg; *cuadros sólidos* control de PBS/diluyente BSA al 0,2%.

Figura 7B: Actividad antitumoral de RFB4(dsFv)PE38 contra tumores de CA46. Los ratones desnudos atípicos se irradiaron el día 3 y se les inocularon 10⁷ células CA46 el día 0. Comenzando el día 4, los ratones con tamaños de tumor medios de 50 mm³ se trataron con 8, 5 ó 1 µg de RFB4(dsFv)PE38 o con 30 µg de RFB4 IgG o con PBS/diluyente BSA al 0,2% los días 4, 6, 7 y 8. El tamaño del tumor se controló midiendo el volumen del tumor y se expresa como el volumen medio del tumor de cada grupo. 3/5 de los ratones que recibían 8 µg de RFB4(dsFv)PE38

murieron durante el tratamiento y 2/5 de los que recibían 5 μ g murieron. Círculos sólidos 8 μ g; cuadros abiertos 5 μ g; círculos abiertos 1 μ g; cruces RFB4 IgG; cuadros sólidos control de PBS/diluyente BSA al 0,2%.

Figuras 8A y 8B: Actividad antitumoral de RFB4(dsFv)PE38 en ratones.

Ratones hembra desnudos se irradiaron (3Gy) el día -3, y el día 0 se les inyectaron por vía subcutánea 10^7 células CA46. Los tumores se formaron el día 4 y los ratones se trajeron cada dos días para 3 dosis de las toxinas y dosis indicadas. Las respuestas eran dependientes de la dosis y no se obtuvieron con las moléculas de control negativo anti-Tac(Fv)-PE38 y RFB4-IgG.

Figuras 9A y 9B: farmacocinética de RFB4(dsFv)-PE38. A los ratones del grupo 3 se les inyectó RFB4(dsFv)-PE38. Se extrajo sangre en los puntos temporales indicados. Se trajeron dos monos Cynomolgus, cada uno con la dosis indicada. Los niveles de plasma se determinaron mediante un ensayo de citotoxicidad.

15 Descripción detallada de la invención

Visión de conjunto

La presente invención proporciona anticuerpos recombinantes e inmunoconjungados que son altamente específicos para CD22. Una molécula exemplar empleaba una exotoxina de *Pseudomonas* (PE) fusionada genéticamente a un anticuerpo anti-CD22 estabilizado con disulfuro, preferiblemente un fragmento Fv (dsFv). De forma bastante inesperada, la immunotoxina PE-dsFv recombinante demostró casi 10 veces más citotoxicidad que el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). El dsFv se produjo mutando los ácidos nucleicos en la posición del aminoácido 44 de la V_H y en la posición del aminoácido 100 de la V_L para que codifiquen una cisteína.

Muchas de las moléculas recombinantes producidas a partir de las construcciones de la presente invención tienen un tercio del tamaño de los conjugados químicos de IgG-toxina y son de composición homogénea. El tamaño pequeño mejorará la penetración del fármaco en tumores sólidos, mientras que la eliminación de la porción constante de la molécula de IgG da como resultado una eliminación más rápida de la circulación de animales experimentales y pacientes. Juntas, estas propiedades rebajarán los efectos secundarios reduciendo el tiempo durante el que la immunotoxina (IT) puede interaccionar con tejidos no diana y tejidos que expresan niveles muy bajos de antígeno. Y pueden producirse fácilmente preparaciones homogéneas de immunotoxinas recombinantes en grandes cantidades.

La sorprendentemente más alta actividad y las propiedades farmacológicas únicas proporcionadas por los inmunoconjungados anti-CD22 estabilizados con disulfuro de la presente invención les hacen agentes terapéuticos altamente eficaces para el tratamiento de malignidades de células B o para agentes de detección de dichas malignidades.

Definiciones

Las unidades, prefijos y símbolos pueden representarse en su forma aceptada en el SI. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3': las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxilo. Los títulos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueden tomarse en referencia a la memoria descriptiva como un todo. Por consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se definen más completamente en referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

El término "CD22" incluye referencia al antígeno CD22 presente en la superficie de las células B de un mamífero tal como ratas, ratones y primates, particularmente seres humanos. Véase, por ejemplo, Wilson *et al.*, J. Exp. Med. 173 (1): 137-146 (1991); Wilson *et al.*, J. Immunol. 150(11): 5013-5024 (1993). La expresión "proteína CD22" incluye referencia a CD22 y fragmentos de CD22 inmunorreactivos con RFB4. Dichos fragmentos inmunorreactivos de CD22 tienen afinidad por un fragmento de unión de RFB4 (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1) al menos 5 veces mayor que una proteína de control no CD22. En el Ejemplo 2 se describe un ensayo exemplar para la afinidad de unión.

La expresión "fragmento citotóxico" con respecto a la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) incluye referencia a una subsecuencia contigua de PE nativa o a una PE nativa que carece de una o más subsecuencias contiguas presentes en la molécula nativa o es una variante modificada de forma conservativa de dichos fragmentos. El fragmento citotóxico conserva al menos el 50%, preferiblemente el 75%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente el 95% de la citotoxicidad de la PE nativa. La secuencia de PE nativa se ha publicado. Los fragmentos de PE citotóxicos ejemplares de PE35, PE38 y PE40 se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.602.095; 5.608.039; y 4.892.827.

"Muestra biológica" como se usa en este documento es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene CD22 o una proteína CD22. Dichas muestras incluyen, aunque sin limitación, esputo, líquido amniótico, sangre, células sanguíneas (por ejemplo, leucocitos) o tejido. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen una muestra de células del sistema inmune (por ejemplo, células B). Una muestra biológica se obtiene típicamente de un eucariota multicelular, preferiblemente un mamífero tal como ratas, ratones, vacas, perros, cobayas o conejos y más preferiblemente un primate tal como macacos, chimpancés o seres humanos.

ES 2 300 122 T3

- Como se usa en este documento, “recombinante” incluye referencia a una proteína producida usando células que no tienen en su forma nativa una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante debido a que han sido alteradas genéticamente mediante la introducción de la secuencia de ácido nucleico aislada apropiada. El término también incluye referencia a una célula o ácido nucleico o vector, que ha sido 5 modificada mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa para esa célula o que la célula se obtiene de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de forma anormal, se sub-expresan o no se expresan absoluto.
- 10 La expresión “agente terapéutico” incluye cualquier número de compuestos peptídicos conocidos actualmente o desarrollados después para actuar como anti-inflamatorios, citocinas, anti-infecciosos, activadores o inhibidores de enzimas, modificadores alostéricos o antibióticos o aquellos que tienen otros efectos terapéuticos.
- 15 La expresión “cantidad eficaz” o “cantidad eficaz para” o “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye referencia a una dosificación suficiente para producir un resultado deseado, tal como inhibir la síntesis de proteínas celulares en al menos el 50% o matar a la célula.
- 20 La expresión “*in vivo*” incluye referencia a dentro del cuerpo o del organismo del que se obtuvo la célula. “*Ex vivo*” significa fuera del cuerpo o del organismo del que se obtuvo la célula.
- 25 El término “inmunoconjulado” incluye referencia a un enlace covalente de un agente terapéutico o una marca detectable con un anticuerpo tal como un fragmento de unión de un anticuerpo. El enlace puede ser directo o indirecto a través de un péptido enlazador.
- 30 El término “marca” o “marca detectable” incluye referencia a cualquier composición detectable por medios espec-troscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.
- 35 El término “toxina” incluye referencia a abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina diftérica (DT), toxina botulínica o toxinas modificadas de las mismas. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente producen la muerte a través de toxicidad en el hígado. PE y DT, sin embargo, pueden modificarse a una forma para su uso como inmunotoxina retirando el componente nativo de dirección de la toxina (por ejemplo, dominio Ia de PE y la cadena B de DT) y sustituyéndolo por un resto de dirección de un anticuerpo diferente.
- 40 Como se usa en este documento “células de mamífero” incluye referencia a células obtenidas de mamíferos incluyendo seres humanos, ratas, ratones, cobayas, chimpancés o macacos. Las células pueden cultivarse *ex vivo*.
- 45 Como se usa en este documento “expresado” incluye referencia a la traducción de un ácido nucleico en una proteína.
- 50 Como se usa en este documento “ácido nucleico” incluye referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma de cadena sencilla o doble y, a menos que se limite de otra forma, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de manera similar a nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular incluye su secuencia complementaria.
- 55 Como se usa en este documento “que codifica” con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para la traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante el uso de codones. Típicamente, la secuencia de aminoácidos está codificada por el ácido nucleico que usa el código genético “universal”. Sin embargo, pueden usarse variantes del código universal, tales como las presentes en algunas mitocondrias vegetales, animales o fúngicas, la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 2306-2309 (1985) o el ciliado *Macronucleus*, cuando el ácido nucleico se expresa usando la maquinaria de traducción de estos organismos.
- 60 Como se usa en este documento “anticuerpo” incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina obtenida mediante generación *in vitro* o *in vivo* de la respuesta humoral e incluye anticuerpos policlónicos y monoclonales. El término también incluye formas manipuladas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos de ratón humanizados), anticuerpos heteroconjungados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos Fv de cadena sencilla recombinantes (scFv) o fragmentos Fv (dsFv) estabilizados con disulfuro (Véase el documento U.S.S.N. 08/077.252). El término “anticuerpo” también incluye formas de unión al antígeno de anticuerpos (por ejemplo, Fab’, F(ab’)₂, Fab, Fv, rIgG e IgG invertida). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede generarse *in vivo* o mediante métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares. Véase, por ejemplo, Huse *et al.*, (1989) Science 246: 1275-1281; y Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546; y Vaughan *et al.*, (1996) Nature Biotechnology. 14: 309-314.
- 65 La expresión “fragmento de unión” con respecto a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que carece sustancialmente de toda la región Fc de un anticuerpo generado *in vivo*. Los fragmentos de unión de anticuerpos ejemplares incluyen fragmentos scFv, dsFv, Fab y (Fab’)₂.

ES 2 300 122 T3

La expresión “condiciones inmunológicamente reactivas” incluye referencia a condiciones que permiten que un anticuerpo generado para un epítopo particular se una a ese epítopo en un grado más detectable y/o a la exclusión sustancial de la unión a sustancialmente todos los otros epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión al anticuerpo y típicamente son los utilizados en protocolos de inmunoensayo de 5 las condiciones que se dan *in vivo*. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications. Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo.

Como se usan en este documento “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable e incluyen 10 referencia a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como de polímeros de aminoácidos de origen natural.

El término “resto” o “resto de aminoácido” o “aminoácido” incluye referencia a un aminoácido que se incorpora 15 en una proteína, polipéptido o péptido (colectivamente “péptido”). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, a menos que se indique otra cosa, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los aminoácidos de origen natural.

Los aminoácidos y análogos mencionados en este documento se describen en ocasiones mediante designaciones 20 taquigráficas de la siguiente manera:

Nomenclatura de Aminoácidos

	Nombre	3 letras	1 letra
25	Alanina	Ala	A
	Arginina	Arg	R
30	Asparagina	Asn	N
	Ácido Aspártico	Asp	D
	Cisteína	Cys	C
35	Ácido Glutámico	Glu	E
	Glutamina	Gln	Q
	Glicina	Gly	G
40	Histidina	His	H
	Homoserina	Hse	-
	Isoleucina	Ile	I
45	Leucina	Leu	L
	Lisina	Lys	K
	Metionina	Met	M
50	Metionina sulfóxido	Met (O)	-
	Metionina metilsulfonio	Met (S-Me)	
	Norleucina	Nle	-
55	Fenilalanina	Phe	F
	Prolina	Pro	P
60	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Triptófano	Trp	W
65	Tirosina	Tyr	Y
	Valina	Val	V

ES 2 300 122 T3

Una “sustitución conservativa”, cuando se describe una proteína, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por lo tanto, “variaciones modificadas de forma conservativa” de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o a la sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.) de modo que incluso las sustituciones de aminoácidos críticos no alteren sustancialmente la actividad. En la técnica se conocen tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar. Los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 10 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 15 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 20 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). Véase también el documento Creighton (1984) Proteins W.H. Freeman and Company.

La expresión “sustancialmente similar”, en el contexto de un péptido, indica que un péptido comprende una secuencia con al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentra la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idéntico en las dos secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

A su vez “identidad de secuencia” en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido incluye referencia a los nucleótidos (o restos) en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia en una ventana de comparación especificado. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se usa con respecto a proteínas, se entiende que las posiciones de restos que no son idénticos a menudo difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas, donde los restos de aminoácidos se sustituyen por otros restos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo carga e hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los especialistas en la técnica conocen bien los medios para realizar este ajuste. Típicamente, esto implica valorar una sustitución conservativa como emparejamiento erróneo parcial en lugar de total, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. De este modo, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da un valor de 1 y a una sustitución no conservativa se le da un valor de cero, a una sustitución conservativa se le da un valor entre cero y 1. La valoración de sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, de acuerdo con el algoritmo de Meyers y Miller, Computer Applic. Biol. Sci. 4: 11-17 (1988) por ejemplo, como se implementó en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, Estados Unidos). Una indicación de que dos secuencias peptídicas son sustancialmente similares es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos generados contra el segundo péptido. Por lo tanto, un péptido es sustancialmente similar a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente en una sustitución conservativa.

Las secuencias de ácido nucleico son “sustancialmente similares” si codifican péptidos sustancialmente similares.

Una “ventana de comparación”, como se usa en este documento, incluye referencia a un segmento de aproximadamente 10-20 restos en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de forma óptima. Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación se conocen bien en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443; mediante el método de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 85: 2444; mediante implementaciones computarizadas de esos algoritmos (incluyendo, aunque sin limitación, CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EEUU); el programa CLUSTAL lo describen ampliamente Higgins y Sharp (1988) Gene, 73: 237-244 y Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5: 151-153; Corpet *et al.*, (1988) Nucleic Acids Research 16, 10881-90; Huang *et al.*, (1992) Computer Applications in the Biosciences 8, 155-65 y Pearson *et al.*, (1994) Methods in Molecular Biology 24, 307-31.

ES 2 300 122 T3

El término “poner en contacto” incluye referencia a la colocación en asociación física directa.

La expresión “célula B maligna” incluye referencia a células B transformadas tales como, aunque sin limitación, células B linfocíticas crónicas (B-CLL), células B de linfoma tal como linfomas de Burkitt y leucemias de células capilares, así como linfocitos B maduros normales. Las células B son células B de mamífero, tales como células B de ratas, ratones y primates particularmente células B humanas. Las células B malignas expresan CD22, en todo o en parte, en su superficie, de modo que los anticuerpos anti-CD22 reconocen y se unen a las células B malignas con una afinidad de unión al menos 5 veces mayor y más preferiblemente al menos 10 veces mayor, que a una célula B no portadora de CD22 usando un ensayo de unión convencional. Un ensayo de unión ejemplar se describe en este documento en el Ejemplo 2.

La expresión “vector de expresión” incluye referencia a una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedadora. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a transcribir y un promotor.

La expresión “péptido enlazador” incluye referencia a un péptido dentro de un fragmento de unión de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable.

Por “célula hospedadora” se entiende una célula que puede soportar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tales como *E. coli* o células eucariotas tales como células de levadura, de insecto, de anfibio o de mamífero.

Como se usa en este documento, el término “anti-CD22” con respecto a un anticuerpo o un fragmento Fv que es específico para CD22, incluye referencia a un anticuerpo que se genera contra CD22, particularmente un epítopo extracelular de CD22. En realizaciones preferidas, el CD22 es un CD22 de primate tal como CD22 humano. Las fuentes de CD22 se conocen bien.

La expresión “fragmento de unión de RFB4” incluye referencia a un anticuerpo que se une al mismo epítopo que RFB4dsFv y tiene al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80% y lo más preferiblemente al menos el 90% de la afinidad de unión del fragmento RFB4dsFv como se describe en este documento en, por ejemplo, el Ejemplo 1. En el Ejemplo 2 se describe un ensayo ejemplar para la afinidad de unión.

35 A. Variantes Modificadas de Forma Conservativa de PE

Las variantes modificadas de forma conservativa de PE o fragmentos citotóxicos de la misma tienen al menos el 80% de similitud de secuencia, preferiblemente al menos el 85% de similitud de secuencia, más preferiblemente al menos el 90% de similitud de secuencia y lo más preferiblemente al menos el 95% de similitud de secuencia a nivel de aminoácidos.

La expresión “variantes modificadas de forma conservativa” se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas de forma conservativa se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina se especifique mediante un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variantes modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un especialista en la técnica entenderá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Como para las secuencias de aminoácidos, un especialista en la técnica entenderá que las sustituciones, delecciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o deleciona un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de forma conservativa” cuando la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

B. Ensayo de Citotoxicidad de PE

Puede ensayarse el nivel deseado de citotoxicidad de las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención mediante ensayos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Los ensayos de citotoxicidad ejemplares se describen en este documento en, por ejemplo, el Ejemplo 4. De este modo, la citotoxicidad puede ensayarse fácilmente en fragmentos citotóxicos de PE y variantes modificadas de forma conservativa de dichos fragmentos. Puede ensayarse simultáneamente la citotoxicidad de gran cantidad de moléculas de PE candidatas mediante métodos bien conocidos

en la técnica. Por ejemplo, puede ensayarse la citotoxicidad de subgrupos de las moléculas candidatas. Los subgrupos de las moléculas candidatas que reaccionan positivamente pueden subdividirse y volver a ensayarse continuamente hasta que se identifique(n) el(los) fragmento(s) citotóxico(s) deseado(s). Dichos métodos permiten la selección rápida de gran cantidad de fragmentos citotóxicos o variantes conservativas de PE.

5

Anticuerpos Anti-CD22

La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra determinantes extracelulares de CD22. CD22 es un antígeno presente en las células B. Los inmunoconjungados descritos en este documento se dirigen contra CD22 usando anticuerpos de la presente invención. Estos anticuerpos son reactivos de forma selectiva en condiciones inmunológicas para los determinantes de CD22 presentados en la superficie de células B y accesibles para el anticuerpo desde el medio extracelular. En realizaciones preferidas el anticuerpo empleado en composiciones de inmunoconjungados es un fragmento de unión de RFB4.

15 La expresión “reactivo de forma selectiva” o “específico para” incluye referencia a la asociación preferencial de un anticuerpo, en todo o en parte, con una célula o tejido portador de la molécula diana CD22 y no a células o tejidos que carecen de esta molécula diana. Se entiende, por supuesto, que puede producirse cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. Sin embargo, la unión específica puede distinguirse como mediada a través del reconocimiento específico de la molécula CD22 diana. Típicamente la unión específica da como resultado una asociación mucho más fuerte entre la molécula suministrada y las células portadoras de CD22 que entre la molécula unida y células que carecen de CD22. La unión específica típicamente da como resultado un aumento de más de 2 veces, preferiblemente de más de 5 veces, más preferiblemente de más de 10 veces y lo más preferiblemente de más de 100 veces, de la cantidad de ligando unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido portador de CD22 en comparación con una célula o tejido que carece de CD22. La unión específica a una proteína en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Diversos formatos de inmunoensayo son apropiados para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos de ELISA de fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

20 Preferiblemente, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos de la presente invención son “condiciones fisiológicas” que incluyen referencia a condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas en el interior de un mamífero vivo o de una célula de mamífero. Aunque se entiende que algunos órganos 25 están sometidos a condiciones extremas, el entorno en el interior del organismo e intracelular normalmente varía en torno a pH 7 (es decir, de pH 6,0 a pH 8,0, más típicamente de pH 6,5 a pH 7,5), contiene agua como disolvente predominante y existe a una temperatura por encima de 0°C y por debajo de 50°C. La osmolaridad está en el intervalo que soporta la viabilidad y proliferación celular.

30 40 El anticuerpo anti-CD22 empleado en la presente invención puede unirse a la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) a través del extremo carboxilo de PE, del extremo amino de PE, a través de un resto de aminoácido interno de PE tal como cisteína o cualquier combinación de los mismos. Análogamente, PE puede unirse directamente a la región pesada, ligera o Fc del anticuerpo. El enlace puede producirse a través de los extremos amino o carboxilo del anticuerpo o a través de un resto de aminoácido interno. Además, pueden unirse múltiples moléculas de PE (por ejemplo, cualquiera de entre 2-10) al anticuerpo anti-CD22 y/o pueden unirse múltiples anticuerpos (por ejemplo, cualquiera de entre 2-5) a una molécula de PE. Los anticuerpos usados en una composición de inmunoconjungado multivalente de la presente invención pueden ser para el mismo o diferentes epítopos de CD22.

45 En realizaciones preferidas de la presente invención, el anticuerpo anti-CD22 es un fragmento de unión del anticuerpo tal como un anticuerpo scFv o dsFv tal como un RFB4dsFv. Los fragmentos Fv son típicamente de aproximadamente 25 kDa y contienen un sitio de unión al antígeno completo. Las cadenas V_H y V_L de los fragmentos Fv se mantienen juntas mediante interacciones no covalentes. Estas cadenas tienden a dissociarse después de la dilución, de modo que se han desarrollado métodos para entrecruzar las cadenas a través de glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un enlazador peptídico. En algunas realizaciones preferidas, el fragmento de unión del anticuerpo Fv tiene una cadena pesada variable de RFB4 sustancialmente similar a la SEC ID N° 2 o una variante modificada de forma conservativa de la misma y/o una cadena ligera variable de RFB4 sustancialmente similar a la SEC ID N° 4 o una variante modificada de forma conservativa de la misma. Dichas variantes conservativas empleadas en fragmentos dsFv conservarán restos cisteína usados para enlaces disulfuro entre las cadenas. Las variantes modificadas de forma conservativa de la secuencia prototípica de la SEC ID N° 2 y/o de la secuencia prototípica de la SEC ID N° 4 tienen al menos el 80% de similitud de secuencia, preferiblemente al menos el 85% de similitud de secuencia, más preferiblemente al menos el 90% de similitud de secuencia y lo más preferiblemente al menos el 95% de similitud de secuencia a nivel de aminoácidos con su secuencia prototípica.

50 55 En algunas realizaciones de la presente invención, los fragmentos de unión del anticuerpo se unen directamente a PE a través de la cadena ligera. Y en algunas realizaciones, los fragmentos de unión del anticuerpo se unen directamente a PE a través de la cadena pesada. Los fragmentos Fv pueden unirse a PE mediante sus extremos amino o carboxilo. En realizaciones preferidas, la PE es PE38.

ES 2 300 122 T3

Las cadenas pesada y ligera variables (V_H y V_L) de fragmentos Fv estabilizados con disulfuro están unidas covalentemente mediante un enlace disulfuro entre restos cisteína presentes en cada una de las dos cadenas. Un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv) es uno en el que la secuencia Fv nativa se ha mutado en una posición específica para dar un resto cisteína que proporcionará un puente disulfuro adicional cuando se forma la molécula de anticuerpo 5 resultante. El par de aminoácidos a seleccionar son, en orden de preferencia decreciente:

V_H 44- V_L 100,

10 V_H 105- V_L 43,

V_H 105- V_L 42,

15 V_H 44- V_L 101,

20 V_H 106- V_L 43,

V_H 104- V_L 43,

25 V_H 44- V_L 99,

30 V_H 45- V_L 98,

V_H 46- V_L 98,

35 V_H 103- V_L 43,

V_H 103- V_L 44,

40 V_H 103- V_L 45,

Más preferiblemente, las sustituciones de cisteína se realizan en las posiciones:

45 V_H 44- V_L 100; o

50 V_H 105- V_L 43.

(La notación de V_H 44- V_L 100, por ejemplo, se refiere a un polipéptido con una V_H que tiene una cisteína en la 40 posición 44 y una cisteína en la V_L en posición 100; estando las posiciones de acuerdo con la numeración dada en el documento "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat, *et al.*, U.S. Government Printing Office, Publicación NIH Nº 91-3242 (1991) ("Kabat y Wu"). V_H y V_L se identifican como se conoce en la técnica, incluyendo Kabat y Wu. Las posiciones de aminoácidos de V_H o V_L en este documento son en referencia a Kabat y Wu. Los fragmentos dsFv comprenden al menos un enlace disulfuro pero pueden comprender 2, 3, 4, 5 o más enlaces según se desee.

45 Aunque las dos cadenas V_H y V_L de algunas realizaciones de anticuerpo pueden unirse directamente entre sí, un especialista en la técnica entenderá que las moléculas pueden separarse mediante un enlazador peptídico constituido por uno o más aminoácidos. Generalmente, el enlazador peptídico no tendrá ninguna actividad biológica específica diferente a unir las proteínas o conservar una distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, 50 los aminoácidos constituyentes del enlazador peptídico pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula tal como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad. Los anticuerpos Fv de cadena sencilla (scfv) opcionalmente incluyen un enlazador peptídico de no más de 50 aminoácidos, generalmente no más de 40 aminoácidos, preferiblemente no más de 30 aminoácidos y más preferiblemente no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunas 55 realizaciones, el enlazador peptídico es un polímero de concatenación de la secuencia Gly-Gly-Gly-Ser (SEC ID Nº 5), preferiblemente 2, 3, 4, 5 ó 6 de dichas secuencias. Los enlazadores peptídicos y su uso se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, anteriormente; Bird *et al.*, *Science*, anteriormente; Glockshuber *et al.*, anteriormente; Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778. Patente de Estados Unidos Nº 5.132.405 y más recientemente en Stemmer *et al.*, *Biotechniques* 14: 256-265 (1993).

60 *Producción de Anticuerpos Recombinantes*

El anticuerpo es un anticuerpo recombinante, típicamente un scFv o dsFv. Se han descrito métodos para preparar anticuerpos Fv. Véase, Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281 (1989); y Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546 (1989); y Vaughan *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology*, 14: 309-314. En general los anticuerpos adecuados se unirán normalmente con una constante de afinidad de al menos 10^{-7} M, preferiblemente al menos 10^{-8} M, preferiblemente al menos 10^{-9} M, más preferiblemente al menos 10^{-10} M y lo más preferiblemente al menos 10^{-11} M.

Afinidad de Unión de Anticuerpos

- Los anticuerpos de esta invención son capaces de unirse específicamente a un epítopo extracelular de CD22. Un anticuerpo anti-CD22 tiene afinidad de unión por CD22, si el anticuerpo se une o es capaz de unirse a CD22 según 5 se mide o se determina mediante ensayos anticuerpo-antígeno convencionales, por ejemplo, ensayos competitivos, ensayos de saturación o inmunoensayos convencionales tales como ELISA o RIA. Esta definición de especificidad se aplica a cadenas sencillas pesadas y/o ligeras, CDR, proteínas de fusión o fragmentos de cadenas pesadas y/o ligeras, que son específicos para CD22 si se unen a CD22 en solitario o en combinación.
- 10 En ensayos de competición, la capacidad de un anticuerpo para unirse a un ligando se determina detectando la capacidad del anticuerpo para competir con la unión de un compuesto conocido para unirse al ligando. Se conocen numerosos tipos de ensayos competitivos y se describen en este documento. Como alternativa, también pueden usarse los ensayos que miden la unión de un compuesto de ensayo en ausencia de un inhibidor. Por ejemplo, la capacidad de una molécula u otro compuesto para unirse a CD22 puede detectarse marcando la molécula de interés directamente 15 o la molécula puede no estar marcada y detectarse indirectamente usando diversos formatos de ensayo de sándwich. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión tales como ensayos de unión competitiva (véase por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 3.376.110, 4.016.043 y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, N.Y. (1988)). También están disponibles ensayos para medir la unión de un compuesto de ensayo a un componente en solitario, en lugar de usando un ensayo de competición. Por ejemplo, pueden usarse 20 anticuerpos para identificar la presencia del ligando. Pueden usarse procedimientos convencionales para ensayos de anticuerpos monoclonales, tales como ELISA (véase Harlow y Lane, *anteriormente*). Para una revisión de diversos sistemas productores de señal que pueden usarse, véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.391.904.

Producción de Inmunoconjungados

- 25 **A. Inmunotoxinas**
- Pueden emplearse toxinas con anticuerpos de la presente invención para producir inmunotoxinas. Las toxinas ejemplares incluyen ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de las mismas, así como las toxinas botulínicas A 30 a F. Estas toxinas están fácilmente disponibles en el mercado de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). La toxina diftérica se aísla de *Corynebacterium diphtheriae*. La ricina es la lectina RCA60 de *Ricinus communis* (ricino). El término también se refiere a variantes tóxicas de la misma. Véase las Patentes de Estados Unidos Nº 5.079.163 y 4.689.401. La aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) se produce en dos formas denominadas RCA₈₀ y RCA₁₂₀ según sus pesos moleculares de aproximadamente 65.000 y 120.000, respectivamente. Nicholson 35 y Blaustein, J. Biochim. Biophys. Acta, 266: 543 (1972). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y destruir a las células. La cadena B une la ricina a restos de galactosa de la superficie celular y facilita el transporte de la cadena A en el citosol (Olsnes *et al.*, Nature, 1974; 249: 627-631). Véase la Patente de Estados Unidos Nº 3.060.165.
- 40 La abrina incluye lectinas tóxicas de *Abrus precatorius*. Los principios tóxicos, abrina a, b, c y d tienen un peso molecular desde aproximadamente 63.000 a 67.000 Da y están constituidas por dos cadenas polipeptídicas A y B unidas mediante disulfuros. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas; la cadena B (abrina-b) se une a restos de D-galactosa. Véase, Funatsu *et al.*, The amino acid sequence of the A-chain of abrin-a and comparison with ricin, Agr. Biol. Chem. 52: 1095 (1988). Véase también Olsnes Methods Enzymol. 50: 330-335 (1978).
- 45 En realizaciones preferidas, la toxina es exotoxina de *Pseudomonas*. La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas a través de la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) catalizando su ADP-ribosilación (catalizando la transferencia del resto de ADP ribosil de NAD oxidado a EF-2).
- 50 La toxina contiene tres dominios estructurales que actúan en concierto para causar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media en la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación en el citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ADP-ribosilación del factor de elongación 2, que inactiva la proteína y causa la muerte celular. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece indefinida, aunque 55 una gran parte de él, aminoácidos 365-380, puede deleciónarse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall *et al.*, J. Biol. Chem. 264: 14266-14261 (1989).
- 60 Las exotoxinas de *Pseudomonas* (PE) empleadas en la presente invención incluyen la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa y variantes modificadas de forma conservativa de PE nativa y sus fragmentos citotóxicos. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen los que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico u otro procesamiento posterior en la célula diana (por ejemplo, como proteína o pre-proteína). Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y PE35. PE40 es un derivado truncado de PE, como se ha descrito anteriormente en la técnica. Véase Pai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3358-62 (1991); Kondo *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 9470-9475 (1988). PE38 es una PE truncada constituida por los aminoácidos 253-364 y 381-613. PE35 es un fragmento carboxilo 65 terminal de 35 kD de PE constituido por una Met en posición 280 seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de la PE nativa. En realizaciones preferidas, se emplea el fragmento citotóxico PE38. PE38 es una pro-proteína que puede activarse a su forma citotóxica después del procesamiento dentro de una célula.

ES 2 300 122 T3

Con las exotoxinas de *Pseudomonas* y anticuerpos proporcionados en este documento, un especialista en la técnica puede construir fácilmente diversos clones que contienen ácidos nucleicos de funcionalidad equivalente, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican la misma PE o secuencia de anticuerpo. Por lo tanto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y conjugados y fusiones de los mismos.

5

B. Métodos Recombinantes

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa mediante métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68: 90-99 (1979); el método del fosfodiéster de Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68: 109-151 (1979); el método de la dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862 (1981); el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981), *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862, por ejemplo usando un sintetizador automatizado, por ejemplo como se describe en el documento Needham-VanDevanter *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12: 6159-6168; y, el método del soporte sólido de la Patente de Estados Unidos Nº 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido de cadena sencilla. Éste puede convertirse en ADN de cadena doble mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como plantilla. Un especialista en la técnica entendería que aunque la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante el ligamiento de secuencias más cortas. Las metodologías de clonación para alcanzar estos fines y los métodos de secuenciación para verificar la secuencia de los ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y se ejemplifican en este documento.

Los inmunoconjungados, PE y anticuerpos de la presente invención también pueden construirse en todo o en parte usando métodos de síntesis peptídica convencionales. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente invención de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud puede conseguirse uniendo el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los restantes aminoácidos en la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida las describen Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; págs. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A., Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963) y Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptides Synthesis*, 2^a ed. Pierce Chem. Co., Rockford, III. (1984). Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse mediante condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los especialistas en la técnica conocen métodos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (por ejemplo mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diclohexilcarbodiimida).

35 Otros ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación apropiadas e instrucciones suficientes para guiar a especialistas en la técnica en muchos ejercicios de clonación se encuentran en el documento Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a Ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), *Methods in Enzymology*, Vol. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Berger y Kimmel (eds.), San Diego: Academic Press, Inc. (1987)) o *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel *et al.*, (eds.), Green Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987). La información sobre el producto de fabricantes de reactivos biológicos y equipo experimental también proporciona información útil en métodos biológicos conocidos. Dichos fabricantes incluyen SIGMA chemical company (San Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratorios, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersberg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen, San Diego, CA y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por un especialista en la técnica.

50 Los ácidos nucleicos que codifican PE nativa o anticuerpos anti-CD22 pueden modificarse para formar la PE, anticuerpos o inmunoconjungados de la presente invención. La modificación mediante mutagénesis dirigida se conoce bien en la técnica. Los ácidos nucleicos que codifican PE nativa o anticuerpos anti-CD22 (por ejemplo, RBF4) pueden amplificarse mediante métodos *in vitro*. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), los sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS) y el sistema de replicación de secuencia autosostenida (SSR). Los especialistas en la técnica conocen bien una amplia diversidad de métodos de clonación, células hospedadoras y metodologías de amplificación *in vitro*.

55 Una vez que el ácido nucleico que codifica una PE, anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjungado de la presente invención se aísla y se clona, puede expresarse la proteína deseada en una célula manipulada genéticamente de forma recombinante tal como bacterias, levaduras, células de insecto y de mamífero. Se espera que los especialistas en la técnica estén informados acerca de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células de eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y las líneas celulares de mieloma. No se realizará ningún intento de describir con detalle los diversos métodos conocidos para la expresión de proteínas en procariotas o eucariotas. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la invención se conseguirá típicamente mediante la unión de forma operativa del ADN o ADNc a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguida de la incorporación en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para replicación e integración en procariotas o eucariotas. Los vectores de expresión típicos contienen terminaciones de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, es deseable construir vectores de expresión

que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para iniciar la traducción y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli* esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión al ribosoma y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y preferiblemente un potenciador obtenido de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus y una secuencia de poliadenilación y pueden incluir secuencias donadoras y aceptoras de corte y empalme. Los plásmidos de la invención pueden transferirse a la célula hospedadora elegida mediante métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro cálcico para *E. coli* y tratamiento con fosfato cálcico o electroporación para células de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos pueden seleccionarse mediante resistencia a antibióticos otorgada por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* y *hyg*.

Un especialista en la técnica entendería que pueden realizarse modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención (es decir, anticuerpo anti-CD22, PE o inmunoconjunto formado a partir de su combinación) sin disminuir su actividad biológica. Pueden realizarse algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula de dirección en una proteína de fusión. Dichas modificaciones las conocen bien los especialistas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poliHis) situados en cualquier extremo para crear sitios de restricción o codones de terminación o secuencias de purificación convenientemente situadas.

20 C. Purificación

Una vez expresados, los inmunoconjuntos recombinantes, anticuerpos y/o exotoxinas de *Pseudomonas* de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase, en general, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad y se prefieren más del 98 al 99% o más homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se deseé, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxina para fines farmacéuticos y después pueden usarse terapéuticamente.

30 Los métodos para la expresión de anticuerpos de cadena sencilla y/o replegamiento a una forma plegada apropiada, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla de bacterias tales como *E. coli*, se han descrito y se conocen bien y son aplicables a los anticuerpos de esta invención. Véase, Buchner *et al.*, *Analytical Biochemistry* 205: 263-270 (1992); Pluckthun, *Biotechnology*, 9: 545 (1991); Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275 (1989) y Ward *et al.*, *Nature* 341: 544 (1989).

35 A menudo, la proteína funcional de *E. coli* u otras bacterias se genera a partir de cuerpos de inclusión y requiere la solubilización de la proteína usando desnaturalizantes potentes y el posterior replegamiento. En la etapa de solubilización, debe estar presente un agente reductor para disolver puentes disulfuro como se conoce bien en la técnica. Un tampón ejemplar con un agente reductor es: Tris 0,1 M, pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE (ditioeritritol) 0,3 M. La reoxidación de puentes disulfuro de la proteína puede catalizarse eficazmente en presencia de reactivos de tiol 40 de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en el documento Saxena *et al.*, *Biochemistry* 9: 5015-5021 (1970) y se describe especialmente por Buchner *et al.*, *Anal. Biochem.*, anteriormente (1992).

45 La renaturalización se realiza típicamente mediante dilución (por ejemplo 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en tampón de replegamiento. Un tampón ejemplar es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado (GSSG) 8 mM y EDTA 2 mM.

Como modificación necesaria para el protocolo del anticuerpo de cadena sencilla, las regiones de cadena pesada y ligera se solubilizaron por separado y se redujeron y después se combinaron en la solución de replegamiento. Se obtiene un rendimiento preferido cuando estas dos proteínas se mezclan en una proporción molar de modo que un exceso molar de una proteína sobre la otra no supere un exceso de 5 veces. Es deseable añadir exceso de glutatión oxidado u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de replegamiento después de que la redistribución redox se complete.

55 Composición Farmacéutica y Administración

Las composiciones de anticuerpo y/o inmunoconjunto de esta invención (es decir PE unida a un anticuerpo), son particularmente útiles para administración parenteral, tal como administración intravenosa o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano. Las composiciones para administración comprenderán normalmente una solución del anticuerpo y/o inmunoconjunto disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Pueden usarse diversos vehículos acuosos, por ejemplo solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del PH y tamponantes, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en base a los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

De este modo, una composición farmacéutica de inmunoconjuguado típica para administración intravenosa sería en un tratamiento total de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 30 mg/kg por día, con la dosificación administrada preferiblemente de forma continua o repartida en una dosificación de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg tres veces al día. Preferiblemente, la dosificación se administraría cada dos días a aproximadamente de 0,2 a 2 mg/kg tres veces al día o de 0,6 a 6 mg/kg por día en una infusión continua. Los métodos exactos para preparar composiciones administrables los conocerán o serán evidentes para los especialistas en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1995).

La composición que incluye el inmunoconjuguado de la presente invención puede administrarse para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente.

Pueden administrarse administraciones sencillas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia según requiera y tolere el paciente. En cualquier caso, la composición debe proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención para tratar eficazmente al paciente. Preferiblemente, la dosificación se administra tres veces al día cada dos días o de forma continua cada dos días, pero puede aplicarse periódicamente hasta que se alcance un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la interrupción de la terapia. Generalmente, la dosis debe ser suficiente para tratar o mejorar síntomas o signos de la enfermedad sin producir toxicidad inaceptable para el paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es la que proporciona alivio subjetivo de un(os) síntoma(s) o una mejoría identificable objetivamente observada por el médico o cualquier otro observador cualificado.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de inmunoconjuguado de la presente invención pueden realizarse como implantes, inyecciones oleosas o sistemas particulados. Para una amplia visión de conjunto de sistemas de suministro de proteínas véase Banga, A.J., "Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems" Technomic Publishing Company, Inc. 1995. Lancaster, PA. Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas menores de aproximadamente 1 pm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 pm de modo que solamente las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas tienen típicamente aproximadamente 100 μ m de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J. 1994. "Nanoparticles" en Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 219-342; Tice y Tabibi. 1992. "Parenteral Drug Delivery: Injectables" en Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339.

Pueden usarse polímeros para usar liberación controlada de iones de composiciones de inmunoconjuguados de la presente invención. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en el suministro controlado de fármacos. Langer, R. 1993. "Polymer-Controlled Drug Delivery Systems", Accounts Chem. Res., 26: 537-542. Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxamer 407, existe como móvil viscoso a temperaturas bajas pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Éste ha demostrado ser un vehículo eficaz para la formulación y el suministro sostenido de interleuquina 2 y ureasa recombinantes. Johnston *et al.*, Pharm. Res., 9: 425-434 (1992); Pec *et al.*, J. Parent. Sci. Tech., 44(2): 58-65 (1990). También puede usarse hidroxapatita como microvehículo para la liberación controlada de proteínas. Ijtema *et al.*, Int. J. Pharm., 112: 215-224 (1994). Pueden usarse liposomas para la liberación controlada así como para la dirección de fármacos atrapados. Betageri *et al.*, 1993 "Targeting of Liposomes" en Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. Se conocen numerosos sistemas adicionales para el suministro controlado de proteínas terapéuticas. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.055.303, 5.188.837, 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, 4.957.735 y 5.019.369; 5.055.303; 5.514.670; 5.413.797; 5.268.164; 5.004.697; 4.902.505; 5.506.206, 5.271.961; 5.254.342 y 5.534.496.

Entre los diversos usos de las proteínas de fusión recombinantes de la presente invención se incluyen diversos estados de enfermedad causados por células humanas específicas que pueden eliminarse mediante la acción tóxica de la proteína. Una aplicación preferida para los inmunoconjuguados de la invención es el tratamiento de células B malignas que expresan CD22. Las células B malignas ejemplares incluyen células B linfocíticas crónicas (B-CLL), células B de linfoma tales como linfomas de Burkitt y leucemias de células capilares.

60 *Kits de Diagnóstico*

En otra realización, esta invención proporciona kits para la detección de CD22 o un fragmento inmunorreactivo del mismo, (es decir, colectivamente una "proteína CD22") en una muestra biológica. Los kits comprenderán típicamente un anticuerpo anti-CD22 de la presente invención que comprende una cadena pesada variable (V_H) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 2 y una cadena ligera variable (V_L) sustancialmente similar a la SEC ID Nº 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD22 será un fragmento Fv anti-CD22; preferiblemente un fragmento dsFv.

ES 2 300 122 T3

Además los kits incluirán típicamente materiales con instrucciones que describan medios de uso de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, para la detección de células B en una muestra). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que se diseña el kit. De este modo, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para detectar la marca (por ejemplo sustratos enzimáticos para marcas enzimáticas, conjuntos de filtros para detectar marcas fluorescentes y marcas secundarias apropiadas tales como HRP de oveja anti-ratón). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos usados de forma rutinaria para la práctica de un método particular. Dichos kits y contenidos apropiados los conocen bien los especialistas en la técnica.

10 *Marcas Detectables*

Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente a una marca detectable. Las marcas detectables adecuadas para dicho uso incluyen cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las 15 marcas útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcas (por ejemplo, 3H, 125I, 35S, 14C o 32P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina y otras usadas habitualmente en un ELISA) y marcas colorimétricas tales como perlas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

20 Los medios para detectar dichas marcas los conocen bien los especialistas en la técnica. De este modo, por ejemplo, las radiomarcas pueden detectarse usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las marcas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido mediante la acción 25 de la enzima sobre el sustrato y las marcas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la marca coloreada.

Otros Restos Terapéuticos

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para dirigir cualquier número de diferentes 30 compuestos de diagnóstico o terapéuticos a células portadoras de antígenos CD22. De este modo, un anticuerpo de la presente invención, tal como un fragmento Fv anti-CD22, puede unirse directamente o mediante un enlazador a un fármaco que se suministrará directamente a células portadoras de CD22. Los agentes terapéuticos incluyen compuestos tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glicoproteínas, radioisótopos, lípidos, hidratos de carbono o virus recombinantes. Los restos de ácido nucleico terapéuticos y de diagnóstico incluyen ácidos 35 nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para entrecruzamiento con ADN de cadena sencilla o doble y oligonucleótidos que forman cadenas triples.

Como alternativa, la molécula unida a un anticuerpo anti-CD22 puede ser un sistema de encapsulado, tal como un 40 liposoma o micela que contiene una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido) u otro resto terapéutico que preferiblemente está protegido de la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios para preparar liposomas unidos a anticuerpos los conocen bien los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.957.735, Connor *et al.*, Pharm. Ther., 28: 341-365 (1985).

45 *Conjugación con el Anticuerpo*

Las moléculas o sistemas terapéuticos, de diagnóstico o encapsulado pueden unirse a los anticuerpos anti-CD22 o inmunoconjungados de la presente invención usando cualquier número de medios conocidos por los especialistas en la técnica. Pueden usarse medios de unión covalente y no covalente con anticuerpos anti-CD22 de la presente invención.

50 El procedimiento de unión de un agente a un anticuerpo u otra molécula de dirección del polipéptido variará de acuerdo con la estructura química del agente. Los polipéptidos contienen típicamente diversos grupos funcionales; por ejemplo grupos de ácido carboxílico (COOH) o amina libre (-NH₂), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en una molécula efectora para unir el efecto a ella.

55 Como alternativa, la molécula de dirección y la molécula efectora pueden derivatizarse para exponer o unirse a grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

60 Un "enlazador", como se usa en este documento, es una molécula que se usa para unir la molécula de dirección a la molécula efectora. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes con la molécula de dirección y con la molécula efectora. Los enlazadores adecuados los conocen bien los especialistas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando la molécula de dirección y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). Sin embargo, en una realización preferida, los enlazadores se unirán a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Puede usarse un enlazador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un agente particular y otro grupo reactivo con un anticuerpo para formar el inmunoconjungado deseado. Como alternativa, la derivatización puede implicar el tratamiento químico de la molécula de dirección, por ejemplo escisión con glicol del resto de azúcar del anticuerpo de glicoproteína con peryodato para generar grupos aldehído libres. Los grupos aldehído libres en el anticuerpo pueden hacerse reaccionar con grupos amina o hidracina libres en un agente para unir el agente a estos. (Véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.671.958). Los procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libres en polipéptidos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, también se conocen (véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.659.839). Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos incluyendo quelatos metálicos de radionúclidos, toxinas y fármacos a proteínas tales como anticuerpos. Véase por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea Nº 188.256; las Patentes de Estados Unidos Nº 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; y 5.589.071; y Borlinghaus *et al.*, Cancer Res. 47: 4071-4075 (1987)).

En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora de la molécula de dirección cuando la molécula químérica ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, pueden usarse conjugados químéricos que comprenden enlaces que pueden escindirse en las proximidades del sitio diana, cuando la molécula efectora se va a liberar en el sitio diana. La escisión del enlace para liberar el agente del anticuerpo puede impulsarse mediante actividad enzimática o condiciones a las que se somete el inmunoconjungado dentro de la célula diana o en las proximidades del sitio diana. Cuando el sitio diana es un tumor, puede usarse un enlazador que puede escindirse en condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo, cuando se expone a ezimas asociadas al tumor o pH ácido).

Los especialistas en la técnica conocen varios enlazadores escindibles diferentes. Véase las Patentes de Estados Unidos Nº 4.618.492; 4.542.225 y 4.625.014. Los mecanismos para liberar a un agente de estos grupos enlazadores incluyen, por ejemplo, la irradiación de un enlace fotolábil y la hidrólisis catalizada por ácidos. La Patente de Estados Unidos Nº 4.671.958, por ejemplo, incluye una descripción de inmunoconjungados que comprenden enlazadores que se escinden en el sitio diana *in vivo* mediante las enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. En vista de la gran cantidad de métodos que se han presentado para unir diversos compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un especialista en la técnica será capaz de determinar un método adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.

30 *Inmunoensayos de Proteína CD22*

Los medios para detectar proteínas CD22 de la presente invención (es decir, CD22 y fragmentos inmunorreactivos con RFB4 del mismo) no son aspectos críticos de la presente invención. Las proteínas CD22 pueden detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios ensayos de unión inmunológico bien reconocidos (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.366.241; 4.376.110; 4.571.288; y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, véase también los documentos *Methods in Cell Biology* Volumen 37: *Antibodies in Cell Biology*, Asai ed. Academic Press, Inc. Nueva York (1993); *Basic and Clinical Immunology* 7^a Edición, Stites & Terr, eds. (1991): Los ensayos de unión inmunológico (o inmunoensayos) típicamente utilizan un anticuerpo para unirse específicamente a, y a menudo inmovilizar, el analito (en este caso proteína CD22). El anticuerpo empleado en inmunoensayos de la presente invención se ha descrito con gran detalle *anteriormente*. El anticuerpo anti-CD22 puede producirse mediante cualquiera de varios medios conocidos por los especialistas en la técnica como se describe en este documento.

45 Los inmunoensayos a menudo utilizan un agente de marcado para unir específicamente y marcar el complejo de unión formado por el agente de captura y el analito. El propio agente de marcado puede ser uno de los restos que comprenden el complejo anticuerpo/analito. De este modo, el agente de marcado puede ser una proteína CD22 marcada o un anticuerpo anti-proteína CD22 marcado. Como alternativa, el agente de marcado puede ser un tercer resto, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo anticuerpo/proteína CD22.

50 En algunas realizaciones, el agente de marcado es un segundo anticuerpo proteína CD22 portador de una marca. Como alternativa, el segundo anticuerpo proteína CD22 puede carecer de marca pero, a su vez, puede tener unido un tercer anticuerpo marcado, específico para anticuerpos de la especie de la que se obtiene el segundo anticuerpo. El segundo puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, al que puede unirse específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina marcada con enzima.

55 Otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G, también pueden usarse como agente marcador. Estas proteínas son constituyentes normales de la paredes celulares de bacterias del tipo estreptococos. Éstas muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulina de diversas especies (véase, en general Kronval *et al.*, (1973) *J. Immunol.*, 11: 1401-1406 y Akerstrom *et al.*, (1985) *J. Immunol.*, 135: 2589-2542). Durante los ensayos, pueden ser necesarias etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, analito, volumen de solución, concentraciones y similares. Normalmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse en un intervalo de temperaturas, tal como de 10°C a 40°C.

ES 2 300 122 T3

Aunque los detalles de los inmunoensayos de la presente invención variarán con el formato particular empleado, el método para detectar una proteína CD22 en una muestra biológica comprende generalmente las etapas de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reacciona específicamente, en condiciones inmunológiamente reactivas, con la proteína CD22. Se permite que el anticuerpo se una a la proteína CD22, en condiciones inmunológiamente reactivas y la presencia de este anticuerpo unido se detecta directa o indirectamente.

Aunque la presente invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión, será obvio que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10

Ejemplo 1

El Ejemplo 1 describe la clonación, expresión y purificación de clones recombinantes que expresan RFB4(scFv) PE38, RFB4 V_H-PE38 y RFB4 V_L.

La RFB4 IgG purificada se redujo con DTT 10 mM y las cadenas ligera y pesada se separaron en SDS-PAGE al 4-20% (Novex) y se transfirieron en una membrana de PVDF. Las bandas de la cadena ligera y pesada se cortaron de la membrana y se sometieron a análisis de secuencia N-terminal. El análisis de aminoácidos N-terminal proporcionó datos de la secuencia de las cadenas ligera y pesada del mAb RFB4 que se proporciona en la Fig. 1.

Para obtener ADNc que codifiquen las regiones variables de cadena pesada y ligera de RFB4, se preparó ARN total a partir de células de hibridoma de RFB4 y se transcribió de forma inversa para producir la primera hebra de ADNc. Posteriormente, se realizó la PCR para amplificar las cadenas pesada y ligera. Se sintetizaron cebadores específicos de cadena pesada y ligera en base a los datos del aminoácido N-terminal y se realizó la amplificación usando estos cebadores junto con cebadores de las regiones constantes CH1 (pesada) y C-_κ (ligera). Esto dio como resultado la amplificación de la porción variable de la cadena pesada más parte de CH1 y la amplificación de la región variable de la cadena ligera más parte de C-_κ. La amplificación por PCR se realizó como se describe en el documento Benhar I. y Pastan I. (1994), Protein Eng. 7, 1509-1515, excepto que se usaron ARN total y los cebadores 5' específicos de RFB4, RFB4 V_H5 y RFB4 V_L5 que se diseñaron a partir de los datos de la secuencia de proteínas N-terminal. Las secuencias de todos los cebadores usados en la clonación se presentan en la Tabla I. Los cebadores se dan de 5' a 3'. Los cebadores yCH1 y C-_κ se diseñaron como se describe (Benhar y Pastan, 1994). RFB4 V_H5 y RFB4 V_L5 se diseñaron de acuerdo con las secuencias de proteína N-terminales determinadas mediante degradación de Edman. RFB4 V_H5 codifica un sitio NdeI (negrita) y una Met de iniciación (negrita y cursiva). RFB4 V_L3 codifica un sitio HindIII (en cursiva). Los cebadores RFB4 V_H3 y RFB4 V_L3 se diseñaron de acuerdo con la secuencia de nucleótidos determinada a partir de clones de ADNc. Los cebadores RFB4 V_H3 y RFB4 V_L5 incluyen secuencias parciales de enlazador Gly₄Ser que se solapan parcialmente (subrayado en cursiva). El cebador RFB4 V_L3 dsFv muta el resto Gly₁₀₀ de V_L a Cys (subrayado), incluye un codón de terminación (negrita) y un sitio EcoRI (en cursiva). El cebador RFB4 V_H dsFv(cys) muta Arg₄₄ de V_H a Cys (subrayado). RFB4 V_H3 dsFv incluye un codón de Lys adicional y un sitio HindIII (en cursiva). RFB4 V_L5 dsFv incluye un sitio NdeI (negrita) y una Met de iniciación (negrita en cursiva).

45

Tabla 1

Tabla I Cebadores de PCR

Cebadores de cadena pesada

50

RFB4 VH5 GGACCTCATATGGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCT (SEC ID Nº 6)

γCH1 AGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATA (SEC ID Nº 7)

AGATCCGCCACCACCGGATCCGCCTCCGCCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC
(SEC ID Nº 8)

55

RFB4 VH3

RFB4 VH3-dsFv CCGGAAGCTTGCAGAGACAGTGACC (SEC ID Nº 9)

60

65

ES 2 300 122 T3

RFB4 VH dsFv(cys) GACCCACTCCAGGCACTTCTCCGAGTC (SEC ID Nº 10)

Cebadores de cadena ligera

5	RFB4 VL5	<u>GGTGGCGGATCTGGAGGTGGGGGAAGCGATATCCAGATGACACAGACT</u> (SEC ID Nº 11)
10	C-κ	TGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG (SEC ID Nº 12)
10	RFB4 VL3	CCGGAAGCTTGATTTCCAGCTTGG (SEC ID Nº 13)
15	RFB4 VL5 dsFv	GGACCTCATATGGATATCCAGATGACCC (SEC ID Nº 14)
15	RFB4 VL3 dsFv	<u>CCGGAATTCAATTGATTTCCAGCTTGGTGCACCAGAACGTCC</u> (SEC ID Nº 15)

15 Los cebadores se dan de 5' a 3'. Los cebadores γCH1 y C-x se diseñaron como se describe (Benhar y Pastan, 1994). RFB4 VH5 y RFB4 VL5 se diseñaron de acuerdo con las secuencias de proteína N-terminal determinadas mediante degradación de Edman. RFB4 VH5 codifica un sitio NdeI (negrita) y una Met de iniciación (negrita en cursiva). RFB4 VL3 codifica un sitio HindIII (en cursiva). Los cebadores 20 RFB4 VH3 y RFB4 VL3 se diseñaron de acuerdo con la secuencia de nucleótidos determinada a partir de clones de ADNc. Los cebadores RFB4 VH3 y RFB4 VL5 incluyen secuencias parciales de enlazador Gly₄Ser que se solapan parcialmente (subrayado en cursiva). El cebador RFB4 VL3 dsFv muta el resto Gly₁₀₀ de V_L a Cys (subrayado), incluye un codón de terminación (negrita) y un sitio 25 EcoRI (en cursiva). El cebador RFB4 VH dsFv(cys) muta el Arg₄₄ de V_H a Cys (subrayado). RFB4 VH3 dsFv incluye un codón de Lys adicional y un sitio HindIII (en cursiva). RFB4 VL5 dsFv incluye un sitio NdeI (negrita) y una Met de iniciación (negrita en cursiva).

30 Los productos de PCR se clonaron en el vector de clonación de PCR (Invitrogen) y se secuenciaron usando reactivos y protocolos de Sequenase (US Biochemical Corp.). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de V_H y V_L se muestran en la Fig. 1.

35 V_H y V_L se reamplificaron usando cebadores RFB4 VH5 y RFB4 VL5 y nuevos cebadores específicos de RFB4, RFB4 VH3 y RFB4 VL3, en base a la secuencia de ADN 3'. V_H3 y V_L5 se diseñaron para hibridar en el extremo 3' de cada ADNc. V_H3 y V_L5 contienen secuencias solapantes que codifican un enlazador peptídico flexible (Gly₄Ser) 3 que se usa para unir las cadenas V_H y V_L (Fig. 2A). La PCR recombinante se realizó usando las cadenas ligera y pesada amplificadas para crear un producto V_H-enlazador-V_L que después se usó para sustituir el V_H-enlazador-V_L 40 del plásmido pULI7 en los sitios NdeI y HindIII, creando pEM9. Éste codifica la construcción de fusión RFB4 V_H-enlazador-V_L-PE38 llamada RFB4(scFv)PE38 (Fig. 2A).

45 La porción de unión de inmunoconjugados unidos por disulfuro está constituida por cadenas V_H y V_L que se unen covalentemente a través de un único resto clave en cada cadena que ha sido mutado a cisteína. Los restos cisteína de cada cadena se asocian para formar un puente disulfuro que generalmente es muy estable y reduce marcadamente la tendencia de la inmunotoxina a agregarse. Reiter *et al.*, (1994), Biochemistry 33:5451-9. Para preparar RFB4(dsFv) PE38, se amplificó V_L usando un cebador 5', RFB4 VL5 dsFv, que introduce un sitio NdeI y un cebador 3' RFB4 VL3 dsFv que introduce un codón de terminación, un sitio EcoRI y que muta un resto 100 glicina a cisteína. V_H se amplificó usando RFB4 VH5 y RFB4 VH3 dsFv que introduce un sitio HindIII y un resto lisina en el extremo C 50 de V_H. Los productos de PCR se dirigieron con NdeI y HindIII (V_H) o EcoRI (V_L) y se usaron para sustituir V_H-enlazador-V_L de pULI7 (V_H) o para sustituir todo el V_H-enlazador-V_L-PE38 (V_L). El producto clonado pEM16 (que codifica RFB4 V_L-Cys₁₀₀) se secuenció y demostró tener incorporada la mutación Gly a Cys (Fig. 2B). V_H-PE38 se 55 mutagenizó para cambiar Arg44 a Cys usando el kit y protocolo de mutagénesis dirigida Muta-Gene (Bio-Rad) y un cebador fosforilado, RFB4 V_H dsFv(cys). La construcción mutada resultante, pEM15, se secuenció y demostró tener incorporada la mutación Arg a Cys (Fig. 2B). Los clones que tenían incorporada la mutación Cys44 se identificaron mediante secuenciación de ADN (Figura 2B).

Expresión y purificación de clones recombinantes

60 Los plásmidos de expresión que codificaban RFB4(scFv)PE38, RFB4 V_H-PE38 y RFB4 V_L (es decir, pEM10 y pEM15 y pEM16) se expresaron por separado en *E. coli* BL21 (λDE3). Studier F. W. y Moffat B.A. (1986), J. Mol. Biol. 189, 113-130. A los cultivos de bacterias transformadas se les indujo una expresión de alto nivel con IPTG, con los productos proteicos acumulándose en cuerpos de inclusión. Las inmunotoxinas de cadena sencilla y unidas por disulfuro se produjeron replegando proteína del cuerpo de inclusión purificada generalmente como se ha descrito. Buchner J., Pastan. y Brinkmann U. (1992) Anal. Biochem. 205, 263-270. En resumen, se prepararon 65 cuerpos de inclusión a partir de pasta celular mediante lisis y lavado en detergente no iónico, después se solubilizó en guanidina-HCl 6 M, Tris 0,1 M, pH 8, EDTA 2 mM. La proteína solubilizada a 10 mg/ml se redujo con 10 mg/ml de DTE (65 mM) y después se diluyó rápidamente en 100 vol. de Tris 0,1 M, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 0,9

ES 2 300 122 T3

mM, EDTA 2 mM a 10°C. Se usaron cantidades en peso iguales de V_L y PE38 para replegar RFB4(scFv)PE38. Las inmunotoxinas de cadena sencilla se replegaron en tampón ajustado a pH 8 (temperatura ambiente) y dsFv se replegó en tampón ajustado a pH 9,5 (temperatura ambiente). Se permitió que las inmunotoxinas se replegaran durante 48 horas y después se dializaron contra urea 100 mM, Tris 20 mM, pH 8 a una conductividad de menos de 3,5 mMho.

5 Las proteínas replegadas apropiadamente se purificaron mediante FPLC de intercambio aniónico secuencial en Q-Sepharose y MonoQ (Pharmacia, Arlington Heights, IL) seguido de filtración en gel en 30 ml de TSK G3000SW (TosoHaas, Montgomeryville, PA). Las inmunotoxinas purificadas se almacenaron a -80°C.

10 Ejemplo 2

El ejemplo 2 describe un ensayo de unión para estudiar las afinidades de unión relativas de inmunotoxinas recombinantes.

15 Las afinidades de unión relativas de las inmunotoxinas recombinantes se midieron mediante competición contra RFB4 IgG marcada con ^{125}I para unirse a células diana CA46 a 4°C. Las células CA46 cultivadas a $> 10^6/\text{ml}$ se lavaron dos veces en tampón de unión enfriado con hielo (RPMI, BES 50 mM, pH 6,8, BSA al 1%) y se sembraron en placas a 10^6 células/150 μl de tampón de unión/pocillo en placas de 96 pocillos en hielo. A las células se les añadieron 0,35 ng de ^{125}I -RFB4 (2,5 x 10^9 cpm/nmol) en tampón de unión y concentraciones variables de RFB4(Fv)PE38 y RFB4 (dsFv)PE38. Las células se incubaron durante 3 horas en hielo, se lavaron dos veces en tampón de unión frío y se solubilizaron en 200 μl de SDS al 0,5%/TE. El ^{125}I -RFB4 unido se cuantificó en un contador gamma Wallac 1470 Wizard. Para los cálculos se usaron las medias de muestras por duplicado. Como se muestra en la Fig. 4, se consiguió un 50% de reducción de la unión de ^{125}I -RFB4 IgG a células CA46 a RFB4(scFv)PE38 70 nM y a Daudi a RFB4 (scFv)PE38 90 nM. La unión a células CA46 se redujo en un 50% a RFB4(dsFv)PE38 10 nM. La RFB4 IgG nativa redujo la unión de RFB4 IgG marcada a células CA46 en un 50% a 4,5 nM y a células Daudi a 10 nM.

25 Ejemplo 3

30 El ejemplo 3 describe un estudio de estabilidad de RFB4(dsFv)PE38 y RFB4(scFv)PE38 durante períodos prolongados a 37°C.

35 La estabilidad de inmunotoxinas recombinantes basadas en PE se ha correlacionado con su actividad *in vitro*. Benhar I. y Pastan I (1994) Protein Eng. 7, 1509-1515. Por consiguiente, RFB4(dsFv)PE38 se incubó a 37°C durante 1-7 días y su actividad citotóxica después de la incubación se comparó con la de inmunotoxina no tratada. RFB4(Fv) PE38 se incubó durante 2-24 horas a 37°C. Las citotoxicidades de las muestras tratadas se compararon con muestras que se mantuvieron a -80°C. De acuerdo con el anterior descubrimiento de alta estabilidad de inmunotoxinas de dsFv a 37°C, RFB4(dsFv)PE38 también era muy estable durante los 7 días a juzgar por el mantenimiento de la actividad citotóxica completa en un ensayo de 24 horas (Fig. 5). En ensayos similares, RFB4(Fv)PE38 no perdió toxicidad 40 después de 24 horas de incubación a 37°C.

45 Ejemplo 4

El ejemplo 4 describe ensayos de citotoxicidad usando diversos tipos celulares.

50 RFB4(scFv)PE38 y RFB4(dsFv)PE38 (Fig. 3) se ensayaron en cinco líneas celulares de linfoma de Burkitt (CA46, Daudi, JD38, Namalwa y Raji) y HUT 102, una línea de células T que es negativa para CD22. Las células Daudi, Raji y Namalwa se adquirieron de ATCC, Rockville, MD. Las células se mantuvieron en RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino (FBS) al 20% (Daudi) o al 10% (resto de líneas celulares), 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM y L-glutamina 2 mM adicional. Para los ensayos de citotoxicidad, se sembraron 4 x 10^4 células/pocillo en 200 μl de medio de cultivo en placas de 96 pocillos. Las inmunotoxinas se diluyeron de forma seriada en PBS/HSA al 0,2% y se añadieron 10 μl a las células. Las placas se incubaron durante los períodos indicados a 37°C, después se pulsaron con 1 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ de ^{3}H -leucina en 10 μl de PBS durante 4-5 horas a 37°C. El material radiomarcado se capturó en tiras de filtro y se contó en un contador de centelleo Betaplate (Pharmacia, Gaithersburg, MD). Se realizó la media de los valores de tres muestras y la inhibición de la síntesis de proteínas se determinó calculando el porcentaje de incorporación en comparación con pocillos de control sin toxina añadida.

55 RFB4(dsFv)PE38 era generalmente 2-7 veces más citotóxica que RFB4(scFv)PE38 para las líneas de Burkitt y ninguna tenía actividad citotóxica significativa para las líneas celulares no de células B (Tabla II).

TABLA II

Citotoxicidad de RFB4(scFv)PE38 y RFB4(dsFv)PE38 para diversas líneas celulares

Línea celular ^a	Fuente	Citotoxicidad CI_{50} (ng/ml) ^b	
		RFB4(scFv)PE38	RFB4(dsFv)PE38
CA46	Linfoma de Burkitt	2	0,6
Daudi		30	20
JD-38		2	0,3
Namalwa		2	1,5
Raji	Célula T	2,5	0,4
HUT102	leucemia	> 1000	> 1000

^a Todas las líneas celulares son de origen humano.

^b Los datos de citotoxicidad se dan como CI_{50} que son las concentraciones de inmunotoxina que provocan una reducción del 50% en la síntesis de proteínas en comparación con controles después de la incubación con células durante 24 horas.

De las líneas de células B ensayadas, había variaciones de sensibilidad a las dos inmunotoxinas de RFB4, teniendo RFB4(dsFv)PE38 un valor de CI_{50} que variaba entre 0,25-0,6 ng/ml en CA46, JD38 y Raji, 1,5 ng/ml en Namalwa y 20 ng/ml en Daudi (Tabla II). Estudios posteriores han demostrado que las células Daudi no pueden procesar eficazmente PE38. La actividad citotóxica de la inmunotoxina RFB4(dsFv)PE38 se compara favorablemente en una base molar con la inmunotoxina RFB4-PE35 que se construyó uniendo PE35 al anticuerpo RFB4 mediante un enlace disulfuro.

Ejemplo 5

El ejemplo 5 describe la medición temporal de la actividad citotóxica de RFB4(dsFv)PE38.

El tiempo necesario para que las células internalicen y procesen la inmunotoxina es de interés terapéutico, puesto que los niveles en sangre de inmunotoxina en pacientes tratados deben permanecer por encima de un umbral citotóxico el tiempo suficiente para intoxicar a las células malignas. Por lo tanto, se estudió el tiempo necesario para la citotoxicidad.

Se incubaron diluciones de RFB4(dsFv)PE38 con células CA46 y JD38 durante 2, 24 y 48 horas en ensayos de citotoxicidad convencionales, excepto para el punto temporal de 2 horas, la inmunotoxina se retiró del medio lavando con RPMI + FCS al 10% y se sustituyó por medio convencional durante las 22 horas restantes del ensayo. Para los ensayos de 48 horas, las células se incubaron de forma continua durante 48 en lugar de 24 horas.

A la exposición de 2 horas le seguían 22 horas adicionales de incubación en medio sin inmunotoxina para permitir un tiempo para el tráfico intracelular necesario para la intoxicación. Para las células CA46 y JD38, el aumento del tiempo de exposición a inmunotoxina de 2 a 24 horas disminuyó la CI_{50} en 5-10 veces. La incubación de células durante 48 horas continuamente con RFB4(dsFv)PE38 dio como resultado poco o ningún efecto adicional sobre la citotoxicidad por encima de la observada después de 24 horas de incubación. Por lo tanto, se concluyó que las líneas celulares requerían más de 2 horas de exposición para unir e internalizar cantidades máximas de inmunotoxina y se intoxican a casi el mayor grado posible a las 24 horas. El aumento de la exposición a períodos de más de 24 horas no proporciona ninguna ventaja *in vitro*.

Ejemplo 6

El ejemplo 6 describe un estudio de toxicidad de RFB4(dsFv)PE38 y RFB4(Fv)PE38 en ratones y su inhibición del establecimiento de tumor de CA46.

La excelente citotoxicidad y estabilidad de RFB4(dsFv)PE38 *in vitro* predecía que esta molécula podría tener una buena actividad anti-tumoral en un modelo animal de linfoma. La capacidad de RFB4(dsFv)PE38 para inhibir

ES 2 300 122 T3

la aceptación del tumor en un modelo de tumor subcutáneo sólido se evaluó inicialmente usando células CA46 de linfoma de Burkitt inyectadas en ratones desnudos. Se usaron dos protocolos. En el primer protocolo, los ratones se irradiaron el día -4 y se les inyectaron 5×10^6 células CA46. Los ratones se dividieron en grupos de cinco y se trataron comenzando 24 h después de la inyección de células CA46 durante cuatro días consecutivos (días 1-4) con diversas

5 cantidades de inmunotoxina, además de diluyente de control (Fig. 6A). En el segundo protocolo, se irradiaron ratones hembra atípicos desnudos el día -3 y después se les inyectaron por vía subcutánea 10^7 células CA46 el día 0 (Fig. 6B). Los volúmenes tumorales se registraron durante 21 días y los ratones que no desarrollaron tumores se controlaron durante 80 días adicionales.

10 10 Toxicidad en ratones

Se realizó un estudio inicial para determinar la toxicidad de las inmunotoxinas en ratones. Se obtuvieron ratones hembra Balb/C de 6-8 semanas de edad del National Cancer Institute, Frederick, MD. Se determinaron los valores de DL₅₀ de múltiples dosis i.v. para un programa de tratamiento de dosis x3 qod (3 dosis, días alternos). Se diluyeron 15 diversas cantidades de inmunotoxinas a $200 \mu\text{l}$ con PBS/HSA al 0,2% y se inyectaron en las venas de la cola cada dos días para 3 dosis. Se inyectaron dos ratones con cada dosis y se controló la pérdida de peso y muerte de los ratones durante 14 días después de la última inyección.

20 Inhibición del establecimiento del tumor de CA46

20 Se obtuvieron ratones hembra desnudos atípicos de 6-8 semanas de edad del National Cancer Institute, Frederick, MD. Los ratones se trataron con 300 rad de irradiación gamma 3 ó 4 días antes de la inyección de células malignas. Las células CA46 se sembraron a $1,8 \times 10^5/\text{ml}$ 2 días antes de la inyección. El día 0, las células CA46 se lavaron en RPMI sin suero y se ajustaron a 10^8 células/ml o 5×10^6 células/ml en RPMI. A cada ratón se le administraron 100 25 μl de la suspensión celular mediante inyección subcutánea. Los ratones se trataron mediante inyección en la vena de la cola cada día durante 4 días consecutivos con diversas cantidades de inmunotoxinas o con materiales de control en $200 \mu\text{l}$ de volumen. La aparición de tumores se controló diariamente o cada dos días durante 21 días después del primer tratamiento. Los ratones en los que no había crecido ningún tumor detectable después de 21 días se controlaron durante hasta 100 días para el crecimiento de tumores en el sitio de inyección. Los ratones inoculados usando el 30 segundo protocolo y tratados con 5 ó 3 μg de RFB4(dsFv)PE38 desarrollaron nódulos tumorales muy pequeños que sufrieron regresión completa después del tratamiento en todos los ratones a la dosis de 5 μg y en 9 de 10 ratones a la dosis de 3 μg . El tratamiento con 1 μg de inmunotoxina retardó significativamente el desarrollo del tumor durante el periodo de observación pero no produjo curaciones.

35 35 Actividad de inmunotoxinas contra tumores de CA46 establecidos

El éxito de los experimentos anti-tumorales (anteriormente) fomentó un examen de la capacidad de RFB4(dsFv) 40 PE38 para erradicar tumores establecidos. Se irradiaron ratones hembra desnudos atípicos el día -3 y después se les inyectaron 10^7 células CA46 el día 0. El día 4, la mayoría de los ratones había desarrollado tumores que tenían un tamaño de $5 \times 5 \text{ mm}$. Comenzando el día 4, los ratones portadores de tumores se trataron diariamente durante 4 días o cada dos días durante 3 días. El tratamiento se administró mediante inyección en la vena de la cola durante 5 días consecutivos con diversas cantidades de inmunotoxinas o con materiales de control. El tamaño del tumor se controló diariamente o cada dos días usando calibradores de precisión. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula $V = l(w^2) \times 0,4$ donde l es longitud y w es anchura.

45 Usando cualquier protocolo de tratamiento, se observó inhibición del crecimiento del tumor con una duración de una semana a 10 días después de la última administración de inmunotoxina (Fig. 7A, 7B). Estas respuestas anti-tumorales se consiguieron usando 8, 5 ó 3 μg de RFB4(dsFv)PE38. Los tumores en todos los ratones tratados finalmente reanudaron el crecimiento. Las dosis de 30 μg de RFB4 IgG en solitario no inhibían significativamente el crecimiento 50 de tumores, mientras que 1 μg de RFB4(dsFv)PE38 podía inhibir el crecimiento durante el periodo de administración de inmunotoxina. Los ratones inoculados y tratados con 5 ó 2 μg de inmunotoxina desarrollaron pequeños nódulos celulares tumorales que sufrieron regresión después del tratamiento y después volvieron a crecer lentamente. El tratamiento con 1 μg de inmunotoxina retardó el desarrollo del tumor en comparación con los controles, pero los tumores crecieron rápidamente después de éste.

55 En resumen, los estudios muestran que las dos moléculas de inmunotoxina son estables a 37°C durante períodos de incubación prolongados. Los perfiles de citotoxicidad en varias líneas celulares positivas para antígeno y negativas para antígeno, demostraron que las moléculas recombinantes eran alta y selectivamente tóxicas para células portadoras de CD22 y no eran tóxicas para líneas negativas para CD22. Se determinó que la duración de la incubación necesaria para la máxima intoxicación de las células era de más de dos horas, pero se observó poco beneficio adicional a períodos de incubación de más de 24 horas. La estabilidad de las inmunotoxinas de RFB4 es por lo tanto compatible con el tiempo necesario para la intoxicación eficaz.

RFB4(dsFv)PE38 es aproximadamente 2-7 veces más activo contra todas las líneas celulares sensibles que RFB4 60 (scFv)PE38, aunque los dos tienen estabilidades similares después de 24 horas. Los estudios de unión competitiva de estas moléculas recombinantes, en comparación con la IgG completa marcada, mostraron una diferencia de capacidad para competir por la unión y una afinidad deducida de RFB4(scFv)PE38 por el antígeno CD22 reducida.

ES 2 300 122 T3

Debido a que la inmunotoxina unida por disulfuro era bastante estable, tenía propiedades de unión similares a las del anticuerpo completo y efectos citotóxicos superiores, se seleccionó para la evaluación adicional en modelos animales. Su actividad anti-tumoral se evaluó ensayando su capacidad para erradicar tumores formados a partir de la inyección de células CA46 en ratones desnudos irradiados y se demostró que podía erradicar células tumorales 5 cuando la administración de inmunotoxina comenzaba 24 horas después de la implantación del tumor y tenía actividad anti-tumoral significativa cuando se administraba a ratones con tumores establecidos. En comparación con tumores tratados con control, el tratamiento con cualquier cantidad de RFB4(dsFv)PE38 de 1-8 μ g provocó que los tumores sufrieran regresión o mantuviieran un volumen estático hasta el final del periodo de tratamiento y durante hasta 10 días adicionales, dependiendo de la dosis.

10

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la citotoxicidad de RFB4(dsFv)-PE38 para células malignas positivas para CD22 de pacientes humanos. 15

Se obtuvieron diecisésis muestras recientes de células de leucemia linfocítica crónica de diferentes pacientes humanos. También se obtuvieron muestras de leucemia de células capilares (HCL), linfoma de células grandes (LCL) y linfoma prolinfocítico (PLL). Estas células se incubaron cada una con RFB4(dsFv)-PE38 durante 24 horas como se 20 ha descrito anteriormente en el Anexo 4 en un ensayo de citotoxicidad. La CI_{50} (ng/ml) de RFB4(dsFv)-PE38 para cada muestra celular se proporciona en la Tabla III a continuación. También se proporciona para comparación el número de sitios de CD22/célula. Es interesante observar que, incluso las células con números relativamente bajos de sitios de CD22, eran destruidas eficazmente por la inmunotoxina. Estos resultados indican que RFB4(dsFv)-PE38 es 25 significativamente tóxica para muchas células humanas recientes de leucemia linfocítica crónica.

25

TABLA III

Sensibilidad de células de leucemia humanas recientes a RFB4(dsFv)-PE38

PT DX Nº	CI ₅₀ (ng/ml) de RFB4(dsFv)-PE38 (BL22)	SITIOS DE CD22/CELULA
1. CLL	10	1050
2. CLL	360	1400
3. CLL	43	430
4. CLL	11	680
5. CLL	> 1000	380
6. CLL	172	1070
7. CLL	> 1000	
8. CLL	86	2200
9. CLL	27	350
10. CLL	91	300
11. CLL	74	1200
12. CLL	61	800
13. CLL	560	1850
14. CLL	16,5	4700
15. CLL	14	4075
16. CLL	4	5040
17. HCL	1,8	
18. LCL	274	
19. PLL	31	600

65

ES 2 300 122 T3

Ejemplo 8

RFB4(dsFv)-PE38 presenta una potente actividad antitumoral contra tumores humanos positivos para CD22 en ratones.

5 Los tumores de CA46 se establecieron en ratones como se ha descrito anteriormente. A los ratones en grupos de tres se les inyectó por vía intravenosa RFB4(dsFv)-PE38. La dosificación se administraba en $\mu\text{g}/\text{kg}$ qod x3 como se muestra en la siguiente tabla IV. También se muestra la Respuesta Completa Total (CR). Una dosis eficaz preferida evidente a partir de este ensayo es 275 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. qod x3.

10 En un ensayo de toxicidad en ratones con tumores establecidos, en el que las dosificaciones de RFB4(dsFv)-PE38 comenzaron a 275 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se obtuvo una DL_{10} a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. qod x3 y se obtuvo una DL_{50} a 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. qod x3. Véase la Tabla V. Se proporciona el número de ratones ensayados y el número de mortalidades por intervalo de dosificación.

15 En un ensayo antitumoral similar en ratones como anteriormente, se realizó un ensayo en el que se administraba RFB4(dsFv)-PE38 mediante infusión i.p. continua a las dosificaciones que se proporcionan a continuación y con los resultados que se proporcionan a continuación en la Tabla VI. Por lo tanto, el fármaco era eficaz para inhibir la actividad tumoral en ratones.

20

TABLA IV

Actividad Antitumoral de RFB4(dsFv)-PE38 en Ratones tratados i.v.

Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$ QOD x3)	CR/total	% de CR
0	0/13	0
200	4/5	80
275	14/14	100
345	7/7	100

Dosis Mínima Eficaz = 275 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. QOD x3

TABLA V

Toxicidad de RFB4(dsFv)-PE38 en Ratones tratados i.v.

Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$ QOD x3)	Muertes/total	% de Mortalidad
0	0/13	0
275	0/14	0
400	0/10	0
600	2/10	20
1200	4/5	80

$\text{DL}_{10} = 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. QOD x3

$\text{DL}_{50} = 900 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. QOD x3

ES 2 300 122 T3

TABLA VI

Actividad antitumoral y toxicidad de RFB4(dsFv)-PE38 mediante infusión i.p. continua en ratones

	Dosis	CR	Muertes
5	50 µg/kg/d	0/5	0/5
10	100 µg/kg/d	5/5	0/5
15	200 µg/kg/d	5/5	0/5
	500 µg/kg/d		4/5
	1000 µg/kg/d		5/5

20 Ejemplo 9

Tolerancia de monos a RFB4(dsFv)-PE38.

25 Puesto que RFB4 se une a CD22 de primate y no se une a CD22 de ratón, se realizaron estudios de toxicología en monos Cynomolgus que toleraban bien RFB4(dsFv)-PE38 hasta 500 µg/kg i.v. QOD x3. Las dosificaciones administradas a los monos eran de la siguiente manera:

30	0,1 µg/kg i.v. QOD x3
	0,5 µg/kg i.v. QOD x3
	1,25 mg/kg i.v. QOD x3
35	1,75 mg/kg i.v. QOD x3
	2,0 mg/kg i.v. QOD x3

40 Los valores patrón de laboratorio se obtuvieron de muestras de suero tomadas los días 2, 4, 6, 8, 15 y 21 y todos estaban en el intervalo normal exceptuando que se observó un aumento de dos veces o menos de las enzimas hepáticas, transaminasas y creatinina. Véase Fig. 9A y 9B. Por lo tanto, RFB4(dsFv)-PE38 puede administrarse a altas dosis a un mamífero en el que el antígeno CD22 es reconocido por el anticuerpo RFB4. Está proyectado un ensayo clínico de Fase I en seres humanos con malignidades positivas para CD22.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inmunoconjungado recombinante, que comprende un agente terapéutico o un péptido marcador detectable unido covalentemente a un fragmento de unión de RFB4 que comprende una cadena V_H con una cisteína en la posición del aminoácido 44 y una cadena V_L con una cisteína en la posición del aminoácido 100, en el que dicha cadena V_H tiene al menos el 90% de identidad con la SEC ID Nº 2 en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos y dicha cadena V_L comprende al menos el 90% de identidad con la SEC ID Nº 4 en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos.
- 10 2. El inmunoconjungado recombinante de la reivindicación 1, en el que dicha cadena V_H tiene al menos el 80% de identidad con la SEC ID Nº 2 y dicha cadena V_L comprende al menos el 80% de identidad con la SEC ID Nº 4.
- 15 3. El inmunoconjungado recombinante de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho agente terapéutico es una toxina.
4. El inmunoconjungado recombinante de la reivindicación 3, en el que dicha toxina es una exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o un fragmento citotóxico de la misma.
- 20 5. El inmunoconjungado recombinante de la reivindicación 4, en el que dicho fragmento citotóxico es PE38.
6. El inmunoconjungado recombinante de la reivindicación 4 ó 5, en el que dicha cadena pesada variable (V_H) está unida mediante un enlace peptídico al extremo amino de dicha toxina.
- 25 7. El inmunoconjungado recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha cadena V_H está unida mediante un enlace peptídico a dicha cadena V_L a través de un péptido enlazador.
8. El inmunoconjungado recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha cadena V_H está unida a dicha cadena V_L a través de un puente disulfuro cisteína-cisteína.
- 30 9. El inmunoconjungado recombinante de la reivindicación 7, en el que dicho péptido enlazador tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID Nº 5.
10. Una casete de expresión que codifica un inmunoconjungado recombinante, que comprende una secuencia que codifica un péptido toxina unido covalentemente a un fragmento de unión de RFB4 que comprende una cadena V_H con una cisteína en la posición del aminoácido 44 y una cadena V_L con una cisteína en la posición del aminoácido 100, en el que dicha cadena V_H tiene al menos el 90% de identidad con la SEC ID Nº 2 en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos y dicha cadena V_L comprende al menos el 90% de identidad con la SEC ID Nº 4 en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos.
- 40 11. La casete de expresión de la reivindicación 10, en la que dicha toxina es una exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o un fragmento citotóxico de la misma.
12. La casete de expresión de la reivindicación 11, en la que dicho fragmento citotóxico es PE38.
- 45 13. La casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además una secuencia que codifica un péptido enlazador que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID Nº 5.
14. Una célula hospedadora aislada que comprende una casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
- 50 15. Un método para inhibir el crecimiento de una célula B maligna, comprendiendo dicho método poner en contacto *in vitro* dicha célula B maligna con una cantidad eficaz de un inmunoconjungado recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 55 16. Uso de un inmunoconjungado recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula B maligna.
17. El uso de la reivindicación 16, en el que dicha célula B maligna se selecciona entre el grupo constituido por una célula B de roedor, una célula B canina y una célula B de primate.

60

65

ES 2 300 122 T3

CADENA LIGERA DE RFB4												
1	D	I	Q	M	T	Q	T	E	S	L	A	S
1	gat	atc	cag	atg	acc	cag	act	aca	tcc	tcc	ctg	tct
21	I	9	C	R	A	S	Q	D	I	S	N	Y
61	att	tgt	tgc	agg	gca	agt	cag	atc	atc	atc	atc	atc
41	D	G	T	V	K	L	I	Y	T	S	G	V
121	gat	gga	act	gtt	aaa	ctc	ctg	atc	tac	aca	tca	ata
61	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S
181	agg	tcc	tgt	ggc	agt	ggg	tct	gga	aca	atc	tat	tat
81	E	D	F	A	T	Y	F	C	Q	Q	N	T
241	gaa	gtt	ttt	gcc	act	tac	ttt	tgc	caa	cag	ggt	aat
101	Q	T	K	L	E	I	K	107				
301	ggc	acc	aag	ctg	gaa	atc	aaa	121				

CADENA PESADA DE RFB4												
1	E	V	Q	L	V	X	S	Q	Q	G	I	V
1	gaa	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	ggg	ggc	tta	gtg
21	S	C	A	A	S	G	F	A	F	S	I	Y
61	tcc	tgt	gca	gcc	tct	ggg	tcc	gtt	tcc	tgt	atc	atc
41	P	E	K	R	L	E	W	V	A	Y	I	S
121	ccg	gag	agg	agg	ctg	gag	tgg	gtc	gca	tac	atc	atc
61	P	D	T	V	K	G	R	F	T	I	S	R
181	cca	gac	act	gtg	aag	ggc	cgt	tcc	acc	atc	tcc	acc
81	L	O	M	S	S	L	K	S	E	D	T	A
241	ctg	caa	atg	agg	agt	ctg	aag	tct	gag	gac	aca	gcc
101	G	Y	G	S	S	Y	G	V	L	F	A	Y
301	ggc	tac	ggt	agt	tgt	tgt	gtt	ttt	gtt	gtt	gtt	gtt
121	T	S	A	123								
361	atc	tct	gca	369								

Figura 1

Figura 2A

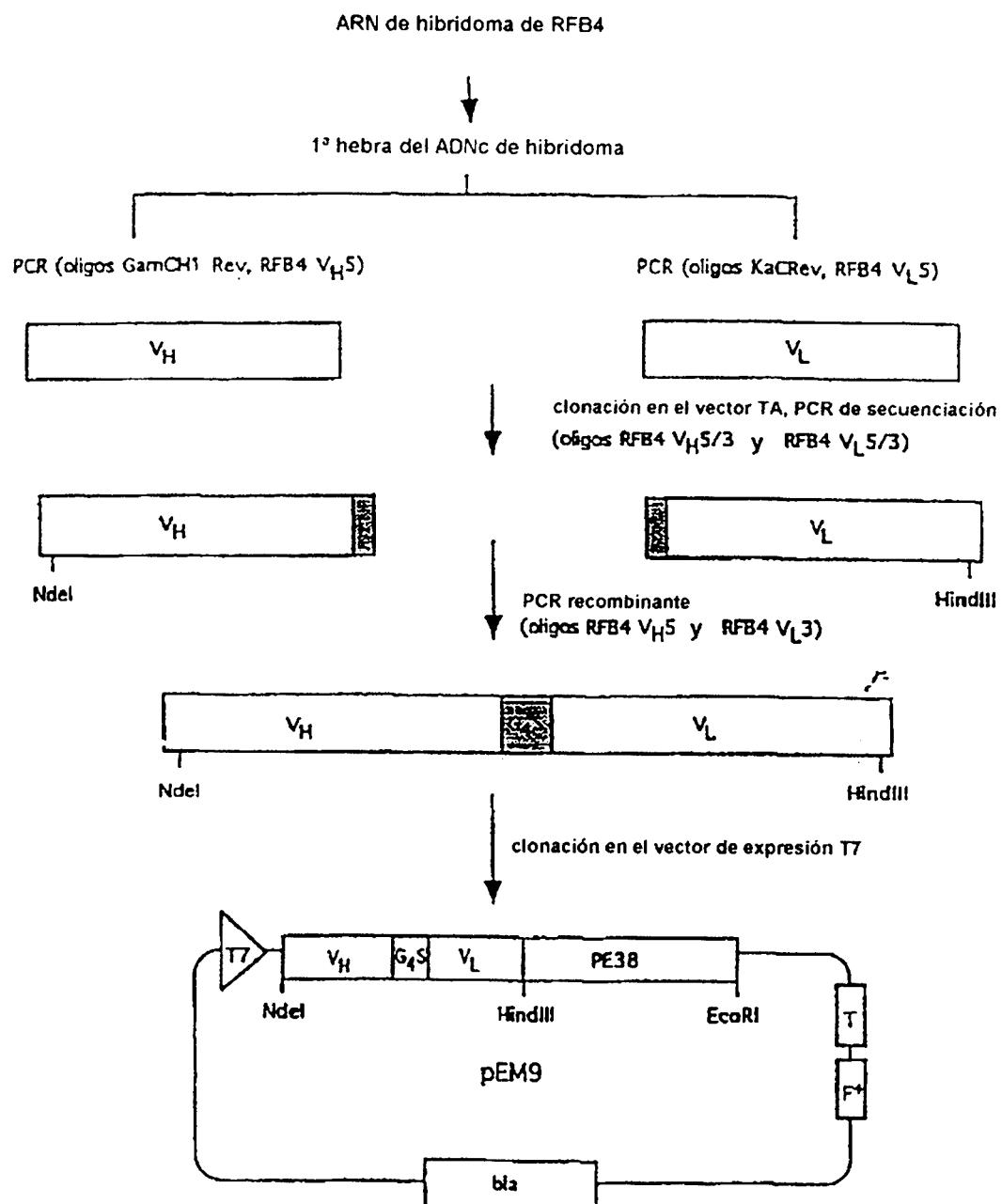


Figura 2B

ARN de hibridoma de RFB4

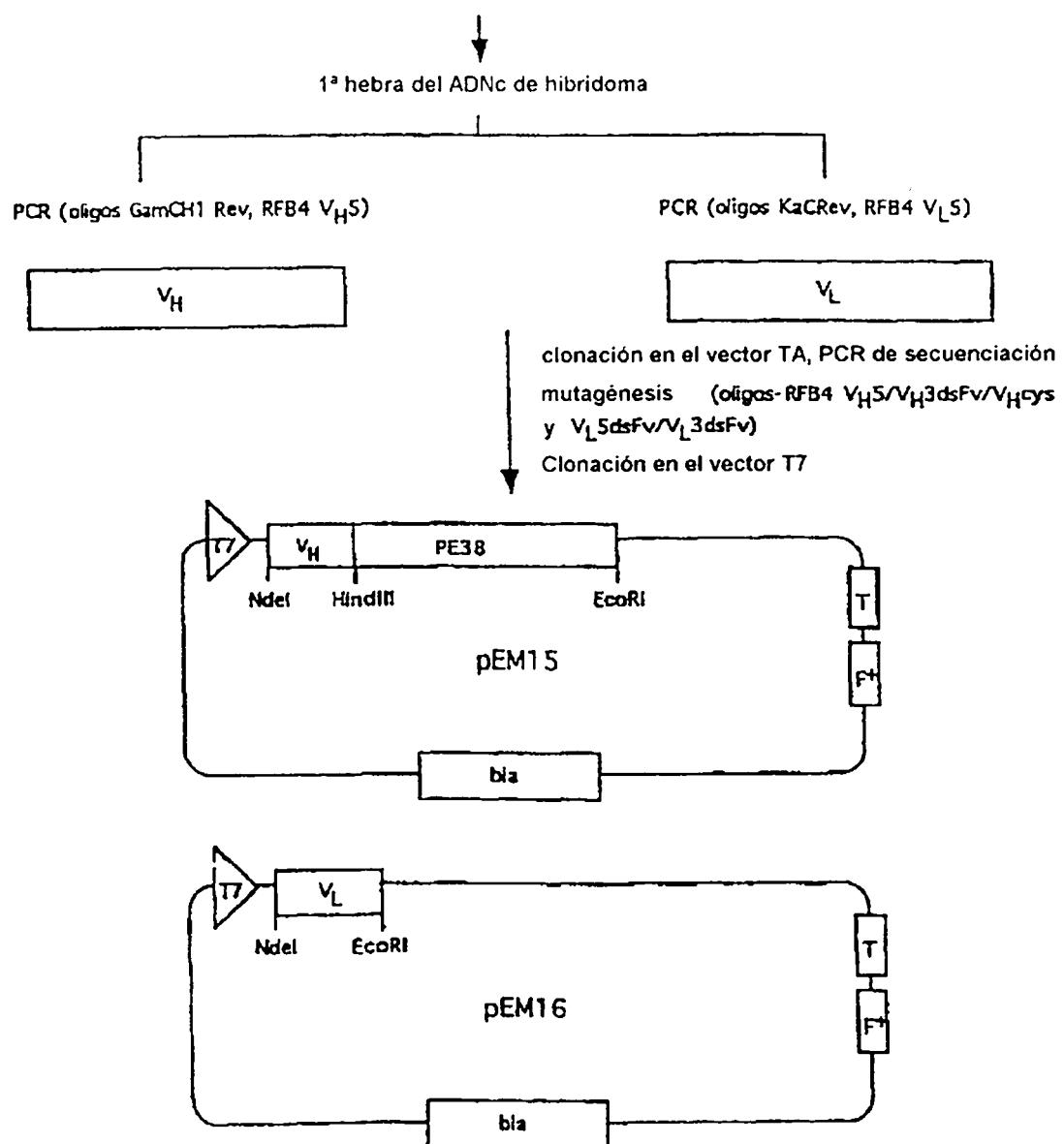


Fig 3

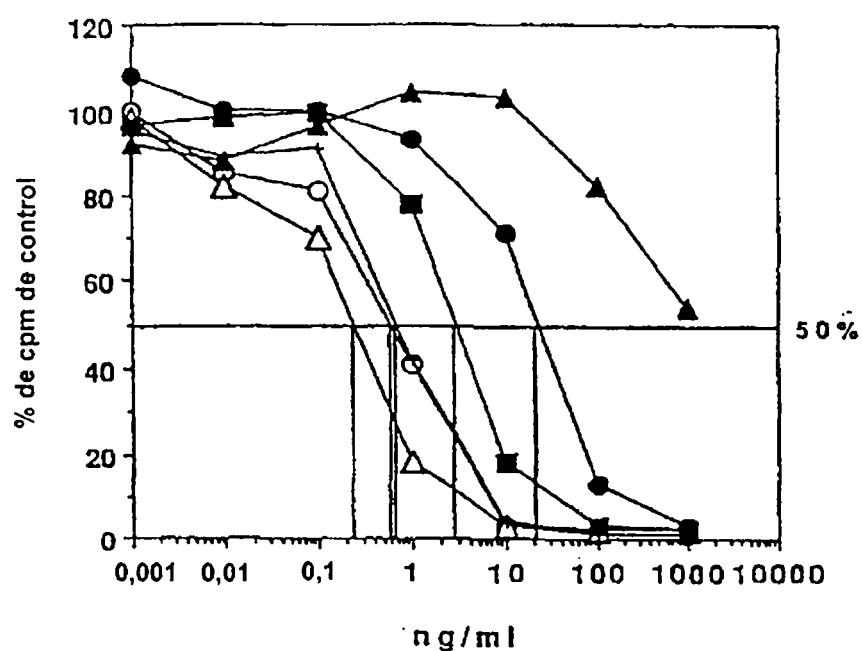


Fig 4

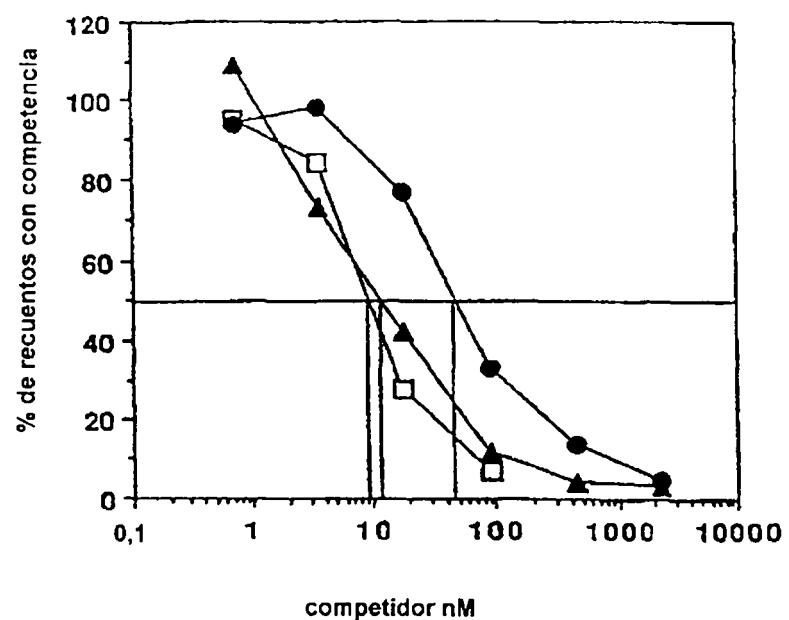
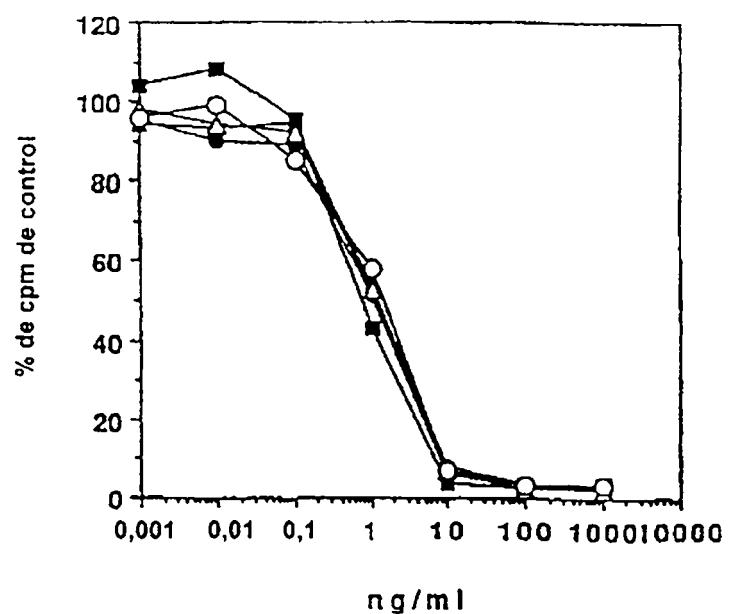
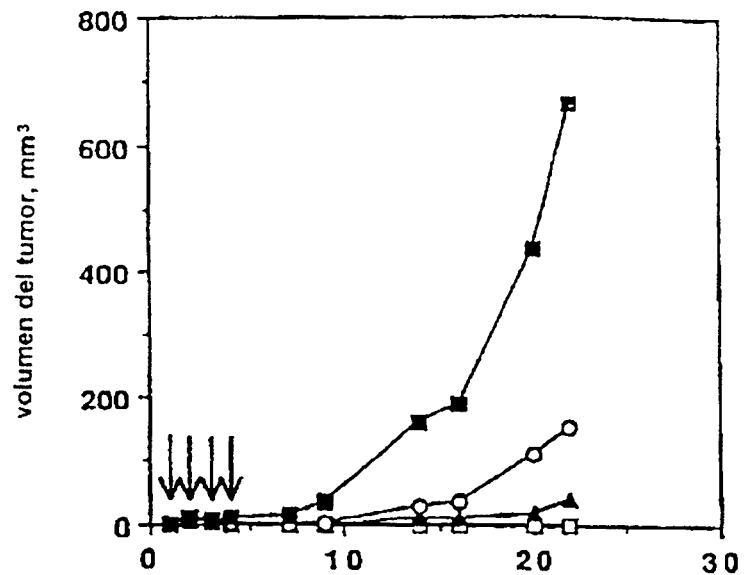


Fig 5

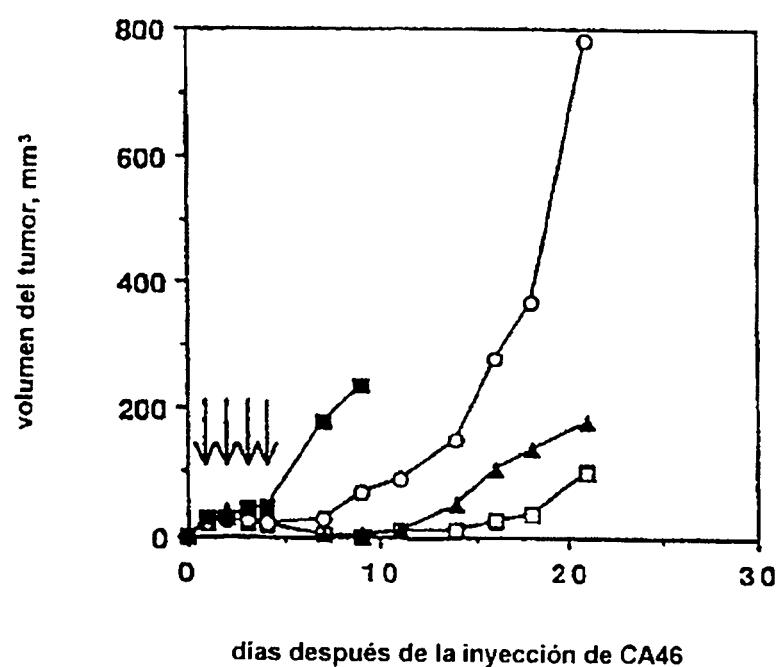


ES 2 300 122 T3

6 A



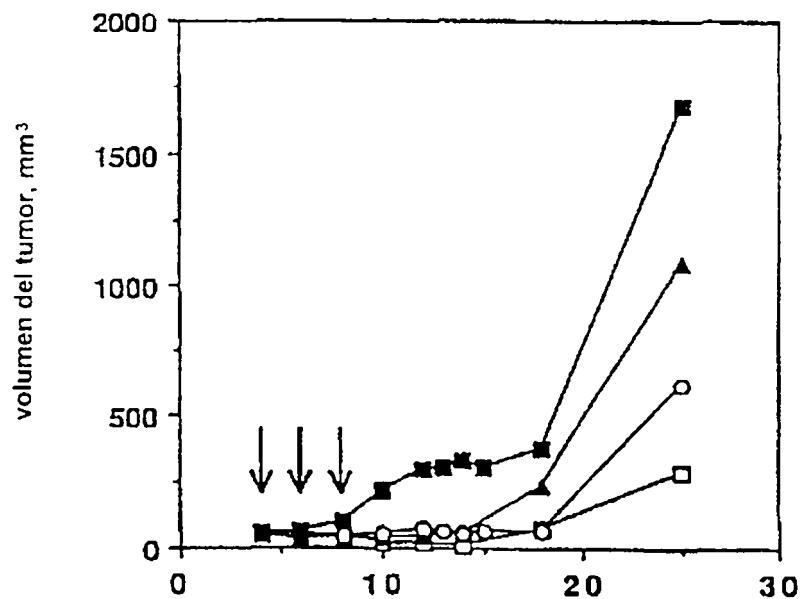
6 B



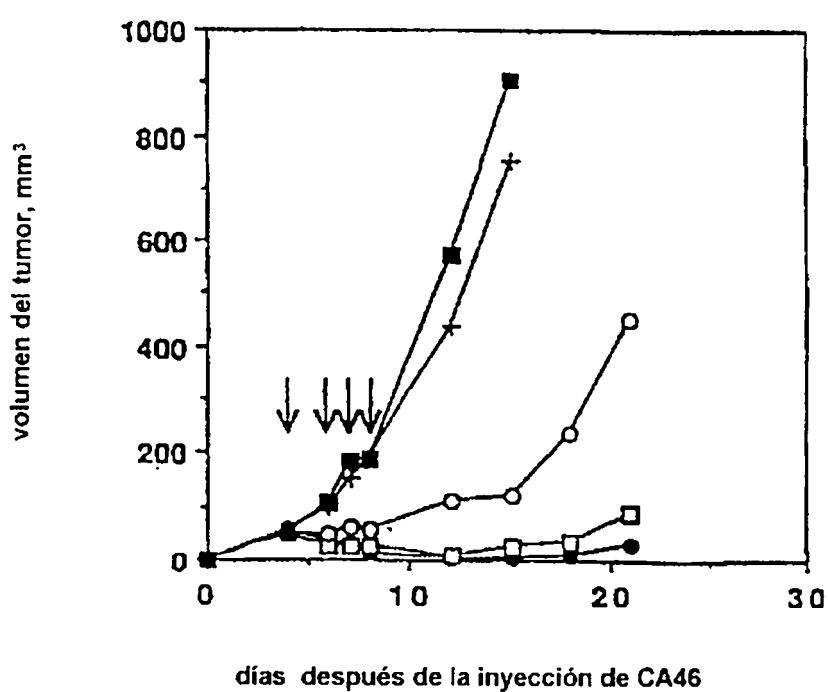
días después de la inyección de CA46

ES 2 300 122 T3

7 A

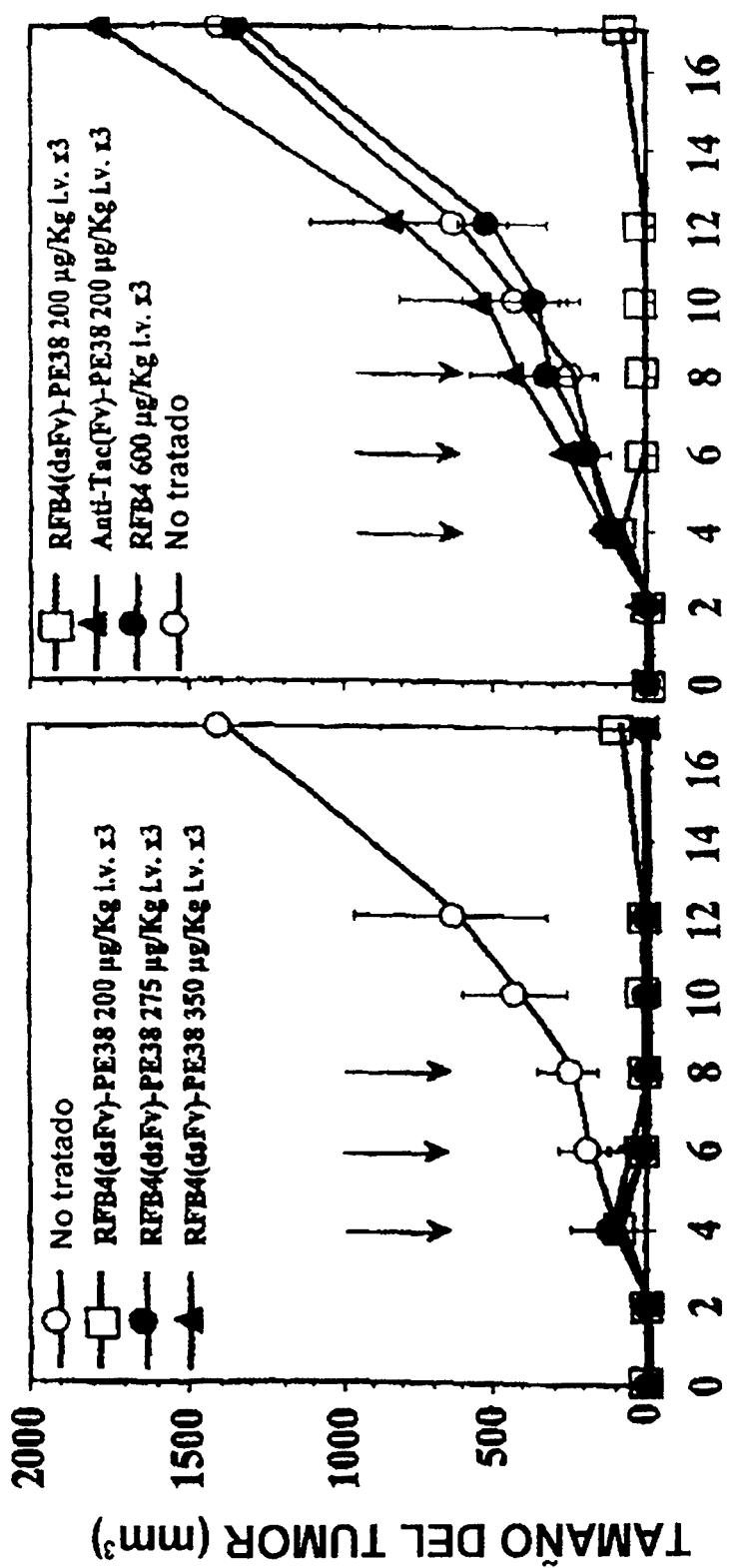


7 B



días después de la inyección de CA46

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE RFB4(dsFv)-PE38 EN RATONES

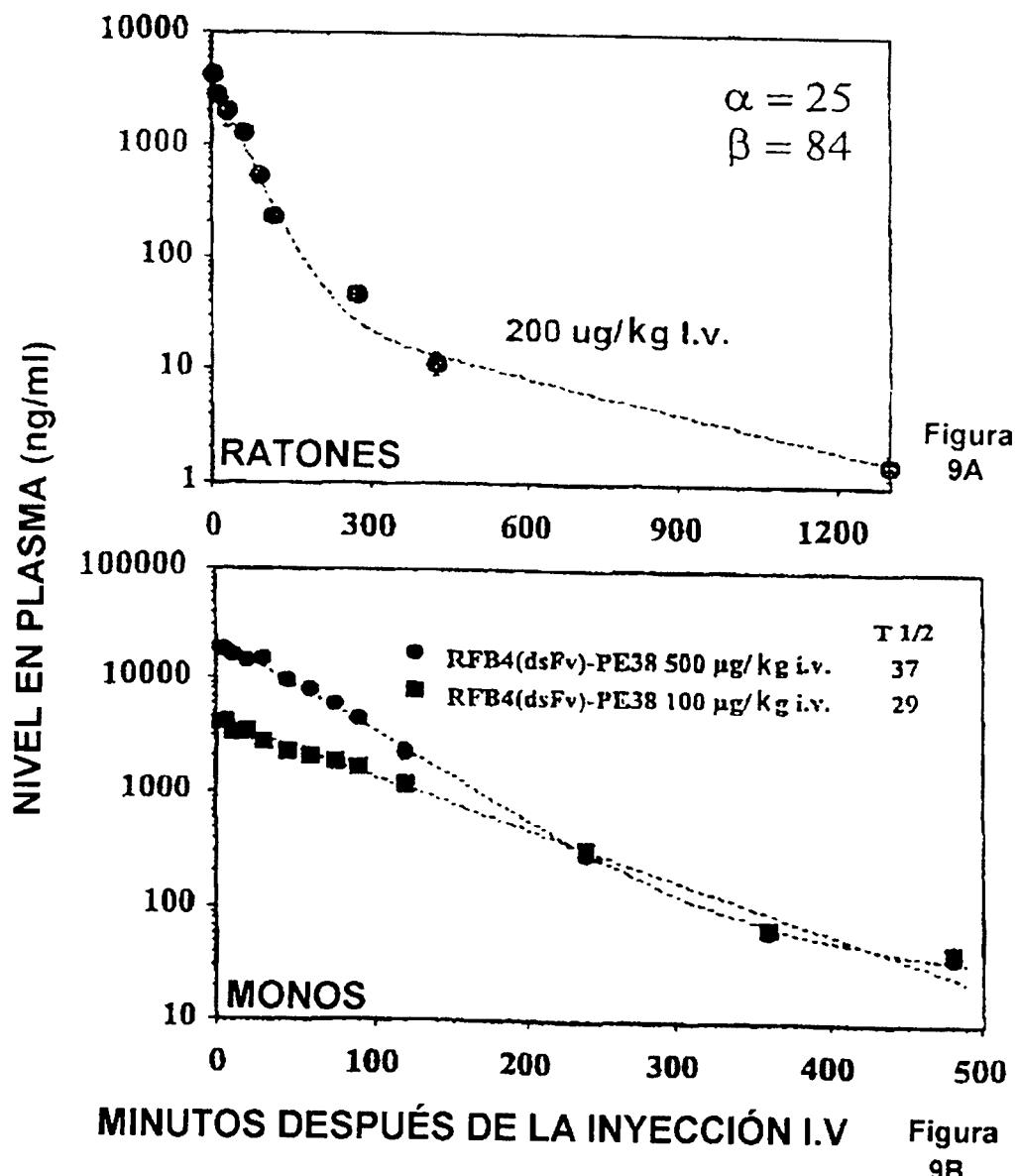


DÍAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE CA46

Figura 8A

Figura 8B

FARMACOCINÉTICA DE RFB4(dsFv)-PE38



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: El Gobierno de los Estados Unidos de América representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos
10 (B) CALLE:
(C) CIUDAD: Bethesda
(D) ESTADO: Maryland
(E) PAÍS: EEUU
15 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20892
(G) TELÉFONO: (301) 496-7056
(H) FAX: (301) 402-0220
20 (I) TÉLEX:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: FitzGerald, David
25 (B) CALLE: 1202 Azalea Drive
(C) CIUDAD: Rockville
(D) ESTADO: Maryland
(E) PAÍS: EEUU
30 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20852
(G) TELÉFONO:
(H) FAX:
35 (I) TÉLEX:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Pastan, Ira
40 (B) CALLE: 11710 Beall Mountain Road
(C) CIUDAD: Potomac
(D) ESTADO: Maryland
(E) PAÍS: EEUU
45 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20892-4255
(G) TELÉFONO:
(H) FAX:
50 (I) TÉLEX:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Mansfield, Elizabeth
55 (B) CALLE: 4710 Bethesda Avenue, Apartamento 408
(C) CIUDAD: Bethesda
(D) ESTADO: Maryland
(E) PAÍS: EEUU
60 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20814
(G) TELÉFONO:
(H) FAX:
65 (I) TÉLEX:

(i) SOLICITANTE:

ES 2 300 122 T3

- (A) NOMBRE: Kreitman, Robert
(B) CALLE: 11915 Reynolds Avenue
(C) CIUDAD: Potomac
5 (D) ESTADO: Maryland
(E) PAÍS: EEUU
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20854
10 (G) TELÉFONO:
(H) FAX:
(I) TÉLEX:
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Anticuerpos Recombinantes e Inmunoconjugados Dirigidos contra Células y Tumores Portadores de CD-22
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 15
20 (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
(A) DIRECCIÓN: Townsend and Townsend and Crew LLP
(B) CALLE: Two Embarcadero Center, Octavo Piso
(C) CUIDAD: San Francisco
25 (D) ESTADO: California
(E) PAÍS: EEUU
(F) CÓDIGO POSTAL: 94111-3834
30 (v) FORMA LEGIBLE POR EL ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: Compatible con IBM PC
35 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nº 1.0, Versión Nº 1.30
(vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD
40 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: WOPCT/US98/05453
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 19-MAR-1998
(C) CLASIFICACIÓN:
45 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/041.437
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20-MAR-1997
50 (viii) INFORMACIÓN DEL MADATARIO/AGENTE:
(A) NOMBRE: Weber, Ellen Lauver
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.762
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 15280-3171PC
55 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
(A) TELÉFONO: (415) 576-0200
(B) FAX: (415) 576-0300
60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 1:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 369 pares de bases
65 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla

ES 2 300 122 T3

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- 5 (ix) ELEMENTO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 1...369
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "cadena pesada de RFB4"
- 10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 1:

	GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly 1 5 10 15	48
15	·TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC GCT TTC AGT ATC TAT Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr 20 25 30	96
20	GAC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val 35 40 45	144
25	GCA TAC ATT AGT AGT GGT GGT ACC ACC TAC TAT CCA GAC ACT GTG Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val 50 55 60	192
30	AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
35	CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
40	GCA AGA CAT AGT GGC TAC GGT AGT AGC TAC GGG GTT TTG TTT GCT TAC Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr 100 105 110	336
45	TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 115 120	369

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 123 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 2:

	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly 1 5 10 15	60
60	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr 20 25 30	65
65	Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val 35 40 45	

ES 2 300 122 T3

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

10 Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
 100 105 110

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 3:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 321 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

30 (ix) ELEMENTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 1...321
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "cadena ligera de RFB4"

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 3:

GAT ATC CAG ATG ACC CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
GAC AGA GTC ACC ATT AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT	96
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr	
20 25 30	
TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC	144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
TAC TAC ACA TCA ATA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC	192
Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC AAC CTG GAG CAA	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln	
65 70 75 80	
GAA GAT TTT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AAT ACG CTT CCG TGG	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp	
85 90 95	
ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA	321
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

ES 2 300 122 T3

- (B) UBICACIÓN: 1...33
(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “cebador de cadena pesada RFB4 VH5”

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 6:

GGACCTCATA TGGAAGTGCA GCTGGTGGAG TCT

33

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 7:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

25 (ix) ELEMENTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: -
(B) UBICACIÓN: 1...24

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “cebador de cadena pesada gamma-CHI”

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 7:

AGCAGATCCA GGGGCCAGTG GATA

24

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 8:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 54 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

50 (ix) ELEMENTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: -
(B) UBICACIÓN: 1...54
(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “cebador de cadena pesada RFB4 VH3”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 8:

AGATCCGCCA CCACCGGATC CGCCTCCGCC TGCAGAGACA GTGACCAGAG TCCC

54

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 9:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) ELEMENTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: -

ES 2 300 122 T3

	(B) UBICACIÓN: 1...27	
	(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena pesada RFB4 VH3 dsFv"	
5	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 9:	
	CCGGAAGCTT TTGCAGAGAC AGTGACC	27
10	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 10:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 28 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
15	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
20	(ix) ELEMENTO:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: -	
	(B) UBICACIÓN: 1...28	
25	(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena pesada RFB4 VH dsFv(cys)"	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 10:	
30	GACCCACTCC AGGCACTTCT CCGGAGTC	28
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 11:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
35	(A) LONGITUD: 48 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
40	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(ix) ELEMENTO:	
45	(A) NOMBRE/CLAVE: -	
	(B) UBICACIÓN: 1...48	
	(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena ligera RFB4 VL5"	
50	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 11:	
	GGTGGCGGAT CTGGAGGTGG CGGAAGCGAT ATCCAGATGA CACAGACT	48
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 12:	
55	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 24 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
60	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
65	(ix) ELEMENTO:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: -	

ES 2 300 122 T3

	(B) UBICACIÓN: 1...24	
	(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena ligera C-kappa"	
5	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 12:	
	TGGTGGGAAG ATGGATACAG TTGG	24
10	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 13:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 25 pares de bases	
15	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(ix) ELEMENTO:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: -	
	(B) UBICACIÓN: 1...25	
25	(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena ligera RFB4 VL3"	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 13:	
30	CCGGAAGCTT TGATTTCCAG CTTGG	25
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 14:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
35	(A) LONGITUD: 28 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
40	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(ix) ELEMENTO:	
45	(A) NOMBRE/CLAVE: -	
	(B) UBICACIÓN: 1...28	
	(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena ligera RFB4 VL5 dsFv"	
50	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 14:	
	GGACCTCATA TGGATATCCA GATGACCC	28
55	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 15:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 48 pares de bases	
60	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
65	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(ix) ELEMENTO:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: -	

ES 2 300 122 T3

(B) UBICACIÓN: 1...48

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "cebador de cadena ligera RFB4 VL3 dsFv"

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 15:

CCGGAATTCA TTATTTGATT TCCAGCTTGG TGCCGCAACC GAACGTCC 48

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65