

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 402**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2007 E 11187714 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2447282**

54 Título: **Anticuerpos anti CD22, sus inmunoconjugados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.05.2006 US 809328 P

29.03.2007 US 908941 P

13.04.2007 US 911829 P

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

22.04.2016

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

EBENS, ALLEN J. JR;

GRAY, ALANE M;

LIANG, WEI-CHING;

WU, YAN y

YU, SHANG-FAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 567 402 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti CD22, sus inmunoconjugados y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti CD22 e inmunoconjugados de los mismos. La invención se refiere además a métodos para usar anticuerpos anti CD22 e inmunoconjugados de los mismos.

10 Antecedentes

Los linfocitos son uno de los muchos tipos de glóbulos blancos producidos en la médula ósea durante el proceso de hematopoyesis. Hay dos poblaciones principales de linfocitos: linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T). Los linfocitos de interés particular en la presente memoria son linfocitos B.

Los linfocitos B maduran dentro de la médula ósea y dejan la médula expresando un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando un linfocito B virgen se encuentra por primera vez con el antígeno para el que es específico su anticuerpo unido a membrana, la célula comienza a dividirse rápidamente y su descendencia se diferencia en linfocitos B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Los linfocitos B de memoria tienen una vida más larga y continúan expresando anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula parental original. Las células plasmáticas no producen anticuerpo unido a membrana sino que producen en su lugar el anticuerpo en una forma que puede secretarse. Los anticuerpos secretados son la principal molécula efectora de inmunidad humoral.

Los trastornos relacionados con linfocitos B incluyen, pero sin limitación, linfoma maligno (linfoma No de Hodgkin, NHL), mieloma múltiple y leucemia linfocítica crónica (CLL, leucemia de linfocitos B (linfocitos B CD5+). Los linfomas No de Hodgkin (NHL), un grupo heterogéneo de cánceres que surgen principalmente de linfocitos B, representan aproximadamente 4 % de todos los cánceres de nuevo diagnóstico (Jemal, A. *et al.*, CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002)). El NHL agresivo comprende aproximadamente 30-40 % de los NHL de adultos (Harris, N. L. *et al.*, Hematol. J. 1: 53-66 (2001)) e incluye linfoma de linfocitos B grande difuso (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de linfocitos T periféricos, y linfoma de células grandes anaplásico. La quimioterapia de combinación de primera línea cura a menos de la mitad de los pacientes con NHL agresivo, y la mayoría de los pacientes con el tiempo sucumben a su enfermedad (Fisher, R. I. Semin. Oncol. 27(supl 12): 2-8 (2000)).

Los trastornos relacionados con linfocitos B también incluyen enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias siguen siendo enfermedades clínicamente importantes en seres humanos. Como el nombre implica, las enfermedades autoinmunitarias actúan mediante el sistema inmunitario del propio cuerpo. Aunque los mecanismos patológicos difieren entre tipos individuales de enfermedades autoinmunitarias, un mecanismo general implica la unión de ciertos anticuerpos (denominados en la presente memoria anticuerpos autorreactivos o autoanticuerpos) a las proteínas endógenas del cuerpo. Los médicos y científicos han identificado más de 70 enfermedades autoinmunitarias clínicamente distintas, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mediada por inmunidad, y lupus tal como lupus eritematoso sistémico. Aunque muchas enfermedades autoinmunitarias son poco comunes, afectando a menos de 200.000 individuos, colectivamente, estas enfermedades aquejan a millones de americanos, una estimación de cinco por ciento de la población, estando las mujeres afectadas desproporcionadamente por la mayoría de las enfermedades. La naturaleza crónica de estas enfermedades conduce a una carga social y financiera enorme.

Los agentes citotóxicos que se dirigen a antígenos de superficie de linfocitos B son un centro importante de terapias de cáncer relacionadas con linfocitos B. Uno de dichos antígenos de superficie de linfocitos B es CD20. Rituximab (Rituxan; Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) e IDEC Pharmaceutical Corp. (San Diego, CA)), un anticuerpo monoclonal quimérico (ratón/humano) anti-CD20 fue el primer anticuerpo terapéutico aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para el tratamiento de NHL recidivante o refractario de grado bajo o folicular (Leonard, J. P. *et al.*, Clin. Canc. Res. 10: 5327-5334 (2004)).

Otros antígenos de linfocitos B, tales como CD19, CD22 y CD52, representan dianas de potencial terapéutico para el tratamiento de linfoma (Grillo-Lopez A. J. *et al.*, Curr Pharm Biotechnol, 2: 301-11, (2001)). CD22 es una sialoglicoproteína restringida a linfocitos B de 135-kDa expresada en la superficie de linfocitos B solamente en los estadios maduros de diferenciación (Dorken, B. *et al.*, J. Immunol. 136: 4470-4479 (1986)). La forma predominante de CD22 en seres humanos es CD22beta que contiene siete dominios de superfamilia de inmunoglobulina en el dominio extracelular (Figura 1) (Wilson, G. L. *et al.*, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)). Una forma variante, CD22 alfa, carece de los dominios de superfamilia de inmunoglobulina 3 y 4 (Stamenkovic, I. y Seed, B., Nature 345: 74-77 (1990)). Se ha mostrado que la unión de ligando con CD22 humano está asociada con los dominios de superfamilia de inmunoglobulina 1 y 2 (también denominados epítomos unidos) (Engel, P. *et al.*, J. Exp. Med. 181: 1581-1586, 1995).

En NHL de linfocitos B, la expresión de CD22 varía de 91 % a 99 % en las poblaciones agresivas e indolentes, respectivamente (Cesano, A. *et al.*, Blood 100: 350a (2002)). CD22 puede actuar como un componente del complejo de activación de linfocitos B (Sato, S. *et al.*, Semin. Immunol. 10: 287-296 (1998)) y como una molécula de adhesión (Engel, PI *et al.*, J. Immunol. 150: 4719-4732 (1993)). Los linfocitos B de ratones deficientes en CD22 tienen una vida más corta y apoptosis potenciada, lo que sugiere un papel clave de este antígeno en la supervivencia de linfocitos B (Otipoby, K. L. *et al.*, Nature (Lond) 384: 634-637 (1996)). Después de la unión con su ligando o sus ligandos naturales o anticuerpos, CD22 se internaliza rápidamente, proporcionando una potente señal coestimuladora en linfocitos B primarios y señales proapoptóticas en linfocitos B neoplásicos (Sato, S. *et al.*, Immunity 5: 551-562 (1996)).

Se han estudiado anticuerpos anti CD22 como terapias potenciales para cánceres de linfocitos B y otras enfermedades proliferativas de linfocitos B. Dichos anticuerpos anti CD22 incluyen RFB4 (Mansfield, E. *et al.*, Blood 90: 2020-2026 (1997)), WO 2005/117986, CMC-544 (DiJoseph, J. F., Blood 103:1807-1814 (2004)) y LL2 (Pawlak-Byczkowska, E. J. *et al.*, Cancer Res. 49: 4568-4577 (1989)). El anticuerpo LL2 (anteriormente denominado HPB-2) es un anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a dirigido contra el antígeno CD22 (Pawlak-Byczkowska, E. J. *et al.* (1989), mencionado anteriormente). Las evaluaciones inmunohistológicas *in vitro* demostraron reactividad del anticuerpo LL2 con 50 de 51 muestras de ensayo de NHL de linfocitos B ensayadas, pero no con otros tumores malignos o tejidos no linfoides normales (Pawlak-Byczkowska (1989), mencionado anteriormente; Stein, R. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 37: 293-298 (1993)).

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26: 151-172; patente de Estados Unidos 4975278) permite el suministro dirigido del resto farmacológico a tumores, y su acumulación intracelular en los mismos, cuando la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) Lancet pp. (15 Mar., 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pp. 475-506). Se busca de este modo la máxima eficacia con mínima toxicidad. Se ha indicado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 21: 183-87 (1986)). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamycin (Kerr *et al.* (1997) Bioconjugate Chem. 8(6): 781-784; Mandler *et al.* (2000) Journal of the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.* (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler *et al.* (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman *et al.* (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen la unión de tubulina, unión de ADN o inhibición de topoisomerasa (Meyer, D. L. y Senter, P. D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" en Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 38 (2003) Capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o ser menos activos cuando están conjugados con anticuerpos grandes o ligandos de receptor de proteínas.

ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG 1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un quelante de enlazador de tiourea (Wiseman *et al.* (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman *et al.* (2002) Blood 99(12): 4336-42; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra Linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (NHL), su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto de un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patentes de Estados Unidos N° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). La cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo huC242 unido mediante el enlazador disulfuro SPP con el resto farmacológico de maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento de cánceres que expresan el antígeno CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo monoclonal anti antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido con el resto farmacológico de maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento potencial de tumores prostáticos. El mismo resto farmacológico de maitansinoide, DM1, se unió mediante un enlazador no de disulfuro, SMCC, con un anticuerpo monoclonal murino de ratón, TA.1 (Chari *et al.* (1992) Cancer Research 52: 127-131). Se indicó que este conjugado era 200 veces menos potente que el conjugado de enlazador disulfuro correspondiente. Se consideró en el mismo que el enlazador SMCC era "no escindible".

Se han aislado varios compuestos peptídicos cortos del molusco marino, *Dolabella auricularia*, y se ha descubierto que tienen actividad biológica (Pettit *et al* (1993) Tetrahedron 49: 9151; Nakamura *et al* (1995) Tetrahedron Letters 36: 5059-5062; Sone *et al* (1995) Journal Org Chem. 60: 4474). También se han preparado análogos de estos compuestos, y se ha descubierto que algunos tienen actividad biológica (para una revisión, véase Pettit *et al* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277). Por ejemplo, la auristatina E (documento US 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino Dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de tubulina uniéndose en el mismo sitio en tubulina que el fármaco anti neoplásico vincristina (G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70: 1-79). Dolastatina 10, auristatina PE y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos de la clase de compuestos de dolastatina, y una amida C terminal.

Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Y de Lewis en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico de CD30 en tumores malignos hematológicos (Klussman, *et al* (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773; Doronina *et al* (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco *et al* (2003) Blood 102(4): 1458-1465; documento US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti CD20 tales como Rituxan® (rituximab) (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos anti-EphB2 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao, *et al*. (2004) Cancer Research 64(3): 781-788); (v) anticuerpo de selectina E (Bhaskar *et al*. (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394); y (vi) otros anticuerpos anti CD30 (documento WO 03/043583). También se ha conjugado monometilauristatina (MMAE) con 2H9, un anticuerpo contra EphB2R que es un receptor de tirosina quinasa TM de tipo 1 con homología cercana entre ratón y ser humano, y se sobreexpresa en células de cáncer colorrectal (Mao *et al* (2004) Cancer Res. 64: 781-788).

Se ha indicado que la monometilauristatina MMAF, una variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C terminal (documentos US 5767237; US 6124431), es menos potente que MMAE, pero más potente cuando se conjuga con anticuerpos monoclonales (Senter *et al*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Número de Resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004). La auristatina F fenilalanina (AFP); una variante de fenilalanina de MMAE se unió a un mAb anti CD70, 1F6, a través del extremo C terminal de 1F6 mediante un espaciador de fenilalanina (Law *et al*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Número de Resumen 625, presentado el 28 de marzo de 2004).

También se han estudiado conjugados de toxina-anticuerpo anti CD22 como compuestos terapéuticos potenciales. Por ejemplo, informes tempranos describían inmunotoxinas que contenían cadena A de ricina dirigidas contra anti CD22 como agentes antineoplásicos potenciales (May, R.D. *et al.*, Chemical Abstracts 106(21): 168656x páginas 35-36 (1987); Ghetie, M. A. *et al.*, Cancer Research 48: 2610-2617 (1988); y Amlot, P. L. *et al.*, Blood 82(9): 2624-2633 (1993)). Cuando la toxina fue un radioisótopo, Epratuzumab, la versión IgG1 humanizada (con injertos de CDR) de LL2, ha mostrado pruebas de actividad terapéutica para el radioinmunoconjugado (Juweid, M. E. *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (Supl 10): 3292s-3303s (1999); Griffiths, G. L. *et al.*, J. Nucl. Med. 44: 77-84 (2003); Linden, O. *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (supl 10): 3287s-3291s (1999)).

Existe la necesidad en la técnica de fármacos adicionales para tratar diversos cánceres relacionados con linfocitos B tales como linfomas tales como linfoma no de Hodgkin y otros trastornos proliferativos de linfocitos B. Los fármacos particularmente útiles para este fin incluyen conjugados de fármaco-anticuerpo anti CD22 dirigidos a linfocitos B que tienen una toxicidad significativamente menor, pero tienen eficacia terapéutica útil. Estas y otras limitaciones y problemas del pasado se abordan por la presente invención.

La mención de cualquier referencia en la presente solicitud no es una admisión de que la referencia es técnica anterior para la presente solicitud.

Sumario

La invención se refiere a anticuerpos anti CD22 y métodos para usarlos.

La invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD22, en el que el anticuerpo comprende seis HVR:

- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2;
- (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4;
- (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6;
- (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10;
- (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; y como se define en las reivindicaciones;

(6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, como se define en las reivindicaciones.

5 El anticuerpo anterior comprende además un armazón que es de un armazón de consenso de subgrupo III VH y un armazón de consenso de subgrupo I VL, como se define en las reivindicaciones.

El anticuerpo que se une a CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada de SEC ID N°: 16 como se define en las reivindicaciones.

10 El anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera de SEC ID N°: 18 como se define en las reivindicaciones.

15 Un polinucleótido que codifica el anticuerpo anterior se describe como un vector que comprende el polinucleótido y una célula hospedadora que comprende el vector. La célula hospedadora puede ser eucariota, por ejemplo la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Se describe un método para preparar un anticuerpo anti CD22, en el que el método comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aislar el anticuerpo.

20 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22 expresado en la superficie de una célula. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de una región de CD22 humano o de ratón que comprende el dominio 1 o el dominio 2 o los dominios 1 y 2. En una realización, la célula es célula de mamífero. En una realización, la célula es una célula humana. En una realización, la célula es una célula cancerosa. En una realización la célula es un linfocito B. En una realización la célula cancerosa es un linfocito B.

25 El anticuerpo anterior es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')₂.

30 Se describe un método para detectar la presencia de CD22 en una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo con CD22, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y CD22. La muestra biológica puede comprender linfocitos B. La muestra biológica puede ser de un mamífero que experimenta o se sospecha que experimenta un trastorno de linfocitos B y/o un trastorno proliferativo de linfocitos B incluyendo, pero sin limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.

40 En un aspecto, se describe un método para diagnosticar un trastorno proliferativo celular asociado con expresión aumentada de CD22, comprendiendo el método poner en contacto una célula de ensayo con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de expresión de CD22 detectando la unión del anticuerpo con CD22; y comparar el nivel de expresión de CD22 por la célula de ensayo con el nivel de expresión de CD22 por una célula de control, en el que un mayor nivel de expresión de CD22 por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con aumento de la expresión de CD22. En un ejemplo, la célula de ensayo es una célula de un paciente que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo celular, tal como un trastorno proliferativo de linfocitos B. En un ejemplo, el trastorno proliferativo celular se selecciona de trastornos de linfocitos B incluyendo pero sin limitación linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto. En un ejemplo, el método comprende determinar el nivel de expresión de CD22 en la superficie de la célula de ensayo y comparar el nivel de expresión de CD22 en la superficie de la célula de ensayo con el nivel de expresión de CD22 en la superficie de la célula de control.

50 En un aspecto, se describe un método para diagnosticar un trastorno proliferativo celular asociado con un aumento en las células, tales como linfocitos B que expresan CD22, comprendiendo el método poner en contacto una célula de ensayo en una muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de anticuerpo unido a células de ensayo en la muestra detectando la unión del anticuerpo con CD22; y comparar el nivel de anticuerpo unido a células en una muestra de control, en el que el nivel de anticuerpo unido se normaliza para el número de células que expresan CD22 en las muestras de ensayo y de control, y en el que un mayor nivel de anticuerpo unido en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control indica la presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con células que expresan CD22.

60 En un aspecto, se describe un método para detectar CD22 soluble en sangre o suero, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de ensayo de sangre o suero de un mamífero que se sospecha que experimenta un trastorno proliferativo de linfocitos B con un anticuerpo anti CD22 de la invención y detectar un aumento de CD22 soluble en la muestra de ensayo en relación con una muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. En un ejemplo, el método de detección es útil como un método para diagnosticar un trastorno proliferativo de linfocitos B asociado con un aumento de CD22 soluble en sangre o suero de un mamífero.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína en los que uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental se reemplazan con un aminoácido cisteína libre como se desvela en el documento WO2006/034488. Cualquier forma de anticuerpo anti CD22 puede modificarse por ingeniería genética de este modo, es decir mutarse. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab parental puede modificarse por ingeniería genética para formar un Fab modificado por ingeniería genética con cisteína, denominado en la presente memoria "TioFab". De forma similar, un anticuerpo monoclonal parental puede modificarse por ingeniería genética para formar un "TioMab". Debería observarse que una mutación en un único sitio produce un único resto de cisteína obtenido por ingeniería genética en un TioFab, mientras que una mutación en un único sitio produce dos restos de cisteína obtenidos por ingeniería genética en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo de IgG. Los anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que se unen preferentemente a polipéptidos CD22 asociados con células. Un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender como alternativa un anticuerpo que comprende una cisteína en una posición desvelada en la presente memoria en el anticuerpo o Fab, resultante del diseño de secuencia y/o selección del anticuerpo, sin alterar necesariamente un anticuerpo parental, tal como por diseño y selección de anticuerpo por presentación de fagos o mediante diseño *de novo* de secuencias marco conservadas de cadena ligera y/o cadena pesada y regiones constantes. Un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína comprende uno o más aminoácidos cisteína libres que tienen un valor de reactividad a tiol en los intervalos de 0,6 a 1,0; 0,7 a 1,0 o 0,8 a 1,0. Un aminoácido cisteína libre es un resto de cisteína que se ha introducido por ingeniería genética en el anticuerpo parental y no es parte de un enlace disulfuro. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína son útiles para la unión de compuestos citotóxicos y/o de formación de imágenes en el sitio de la cisteína introducida por ingeniería genética mediante, por ejemplo, una maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad de tiol de un resto de Cys con un grupo de maleimida es aproximadamente 1000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de restos de lisina o el grupo amino N terminal. La funcionalidad específica de tiol en reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren mayor pH (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres).

En un ejemplo, un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína anti CD22 comprende una cisteína introducida por ingeniería genética en una cualquiera de las siguientes posiciones, en las que la posición se numera de acuerdo con Kabat *et al.* en la cadena ligera (véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y de acuerdo con la numeración de EU en la cadena pesada (incluyendo la región Fc) (véase Kabat *et al.* (1991), mencionado anteriormente), en el que la región constante de cadena ligera representada por el subrayado en la Figura 17A comienza en la posición 108 (numeración de Kabat) y la región constante de cadena pesada representada por el subrayado en las Figuras 17B y 17C comienza en la posición 118 (numeración de EU). La posición también puede denominarse por su posición en la numeración secuencial de los aminoácidos de la cadena ligera o la cadena pesada de longitud completa mostradas en las Figuras 17A-17C. De acuerdo con un ejemplo de la invención, un anticuerpo anti CD22 comprende una cisteína introducida por ingeniería genética en LC-V205C (número de Kabat: Val 205; número secuencial 210 en la Figura 17A modificado por ingeniería genética para que sea Cys en esa posición). La cisteína introducida por ingeniería genética en la cadena ligera se muestra en texto doble subrayado en negrita, en la Figura 17A. De acuerdo con el ejemplo, un anticuerpo anti CD22 comprende una cisteína introducida por ingeniería genética en HC-A118C (número de EU: Ala 118; número secuencial 121 en la Figura 17B modificado por ingeniería genética para que sea Cys en esa posición). La cisteína introducida por ingeniería genética en la cadena pesada se muestra en texto doble subrayado en negrita en la Figura 17B. De acuerdo con un ejemplo, un anticuerpo anti CD22 comprende una cisteína introducida por ingeniería genética en Fc-S400C (número de EU: Ser 400; número secuencial 403 en la Figura 17C modificado por ingeniería genética para que sea Cys en esa posición). La cisteína introducida por ingeniería genética en la región Fc de la cadena pesada se muestra en texto doble subrayado en negrita, en la Figura 17C. En otros ejemplos, la cisteína introducida por ingeniería genética de la cadena pesada (incluyendo la región Fc) está en una cualquiera de las siguientes posiciones (de acuerdo con la numeración de EU): 41, 88, 116, 118, 120, 171, 282, 375 o 400. Por lo tanto, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo anti CD22 parental de la invención son: A41C, A88C, S116C, A118C, T120C, A171C, V282C, S375C o S400C. En otros ejemplos, la cisteína introducida por ingeniería genética de la cadena ligera está en una cualquiera de las siguientes posiciones (de acuerdo con la numeración de Kabat): 15, 43, 110, 144, 168, 205. Por lo tanto, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo parental anti CD22 de la invención son: V15C, A43C, V110C, A144C, S168C o V205C.

Un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres, en el que anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína se une a un polipéptido de CD22 y se prepara por un procedimiento que comprende reemplazar uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo parental anti CD22 por cisteína en el que el anticuerpo parental comprende al menos una secuencia de HVR seleccionada de:

- (a) una secuencia de HVR-L1 RSSQSIVHSNGNTFLE (SEC ID N°: 9) o secuencia RSSQSNHSGNTFLE (SEC ID N°: 10) (Figura 2B);

(b) una secuencia de HVR-L2 KVSNRFS (SEC ID N°: 12) (Figura 2B);

(c) una secuencia de HVR-L3 FQGSQFPYT (SEC ID N°: 14) (Figura 2B);

5 (d) una secuencia de HVR-H1 GYEFSRSWMN (SEC ID N°: 2) (Figura 2A);

(e) una secuencia de HVR-H2 GRIYPGDGDTNYSKGFKG (SEC ID N°: 4) (Figura 2A); y

(f) una secuencia de HVR-H3 DGSSWDWYFDV (SEC ID N°: 6) (Figura 2A).

10

Un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en la presente memoria, o una secuencia de aminoácidos de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que carece del péptido señal como se desvela en la presente memoria.

15

20

También se describe en la presente memoria un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en la presente memoria, (b) una secuencia de aminoácidos de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que carece del péptido señal como se desvela en la presente memoria, (c) un dominio extracelular de una proteína de anticuerpo modificada para ingeniería genética con cisteína transmembrana, con o sin el péptido señal, como se desvela en la presente memoria, (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en la presente memoria o (e) cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo modificada por ingeniería genética con cisteína de longitud completa como se desvela en la presente memoria.

25

30

También se describe un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína aislado sin la secuencia señal N terminal y/o sin la metionina de inicio y se codifica por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos como se describe en la presente memoria. También se describen en la presente memoria procedimientos para producir los mismos, en los que los procedimientos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y recuperar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína del cultivo celular.

35

40

También se describe un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína aislado que tiene dominios transmembrana suprimido o dominio transmembrana inactivado. También se describen en la presente memoria procedimientos para producir los mismos, en los que estos procedimientos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y recuperar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína del cultivo celular.

45

También se describen anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína quiméricos anti CD22 aislados, que comprenden cualquiera de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína descritos en la presente memoria fusionados con un polipéptido heterólogo (no CD22). Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína descritos en la presente memoria fusionados con un polipéptido heterólogo tal como, por ejemplo una secuencia marcadora epitópica o una región Fc de una inmunoglobulina.

50

El anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario o anticuerpo que inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo polipeptídico anti CD22 con su epítipo antigénico respectivo. Los anticuerpos pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares de acuerdo con la invención. Los anticuerpos pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferentemente inhiben el crecimiento o proliferación de o inducen la muerte de una célula con la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

55

60

También se describen en la presente memoria vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti CD22 descritos en la presente memoria y anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína descritos anti CD22. También se describen células hospedadoras que comprenden cualquiera de dichos vectores. Como ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, células *E. coli* o células de levadura.

65

Se describe además un procedimiento para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

- 5 Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluyen anticuerpos específicos para receptores de superficie celular y transmembrana, y antígenos asociados con tumor (TAA). Dichos anticuerpos pueden usarse como anticuerpos desnudos (no conjugados con un fármaco o resto marcador) o como conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína pueden estar acoplados de forma específica de sitio y eficazmente con un reactivo sensible a tiol. El
- 10 reactivo sensible a tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo marcador de captura, un reactivo fluoróforo o un intermedio de enlazador farmacológico. El anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse en un soporte de fase sólida y/o conjugarse con un resto farmacológico. La reactividad del tiol puede generalizarse a cualquier anticuerpo en el que pueda realizarse sustitución de aminoácidos con aminoácidos de cisteína reactivos dentro de los intervalos en la cadena ligera
- 15 seleccionados de los intervalos de aminoácidos: L-10 a L-20; L-38 a L-48; L-105 a L-115; L-139 a L-149; L-163 a L-173; y dentro de los intervalos en la cadena pesada seleccionados de los intervalos de aminoácidos: H-35 a H-45; H-83 a H-93; H-114 a H-127; y H-170 a H-184, y en la región Fc dentro de los intervalos seleccionados de H-268 a H-291; H-319 a H-344; H-370 a H-380; y H-395 a H-405, en los que la numeración de las posiciones de aminoácidos comienza en la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa secuencialmente a continuación como se desvela en el documento WO2006/034488. La reactividad de tiol también puede generalizarse a ciertos dominios de un anticuerpo, tales como el dominio constante de cadena ligera (CL) y los dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Pueden realizarse reemplazos de cisteína que dan como resultado valores de reactividad de tiol de 0,6 y mayores en los dominios constantes de cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Dichos anticuerpos y sus usos se desvelan en el documento WO2006/034488.
- 25

- Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína preferentemente conservan la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de anticuerpo parental, de tipo silvestre. Por lo tanto, los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína son capaces de unirse, preferentemente de forma específica, con antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados con tumores (TAA), proteínas de receptores de superficie celular y otras moléculas de superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas con (por ejemplo, para las que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) el desarrollo o diferenciación
- 30 tisular, linfocinas, citocinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en la vasculogénesis y moléculas asociadas con (por ejemplo, para la que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) la angiogénesis. El antígeno asociado a tumor puede ser un factor de diferenciación de grupos (es decir, una proteína CD, incluyendo pero sin limitación CD22). Los anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína conservan la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de anticuerpo anti CD22 parental. Por lo tanto, los anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína son capaces de unirse, preferentemente de forma específica, con antígenos CD22 incluyendo isoformas anti CD22 humanas beta y/o alfa, incluyendo cuando dichos antígenos se expresan en la superficie de células, incluyendo, sin limitación, linfocitos B.
- 35

- 45 Un anticuerpo puede conjugarse con otros agentes reactivos a tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otro compañero de conjugación reactivo a tiol (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. in *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). El compañero puede ser un agente citotóxico (por ejemplo una toxina tal como doxorubicina o toxina pertussis), un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para un metal de formación de imágenes o radioterapéutico, un marcador peptidílico o no peptidílico o un marcador de detección, o un agente modificador de la eliminación tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipófilo.
- 50

- 55 En un aspecto, los anticuerpos pueden conjugarse con cualquier resto marcador que puede estar unido covalentemente con el anticuerpo mediante un resto reactivo, un resto activado, o un grupo de tiol de cisteína reactivo (Singh *et al* (2002) *Anal. Biochem.* 304: 147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R. L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2ª ed. CRC Press, Boca Raton, FL). El marcador unido puede actuar para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interaccionar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o segundo marcador, por ejemplo para proporcionar FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o aumentar la afinidad de unión con el antígeno o ligando; (iv) afectar a la movilidad, por ejemplo movilidad electroforética o permeabilidad celular, por carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar un resto de captura, para modular la afinidad del ligando, unión de anticuerpo/antígeno o formación de complejos iónicos.
- 60
- 65

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína marcados pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específicos. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará normalmente con un resto detectable. Está disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

Radioisótopos (radionúclidos), tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}Bi . Los anticuerpos marcos con radioisótopo son útiles en experimentos de formación de imágenes dirigidos a receptor. El anticuerpo puede marcarse con reactivos de ligando que se unen, se quelan o forman complejo de otro modo con un metal radioisótopo en el que el reactivo es sensible al tiol con cisteína introducida por ingeniería genética del anticuerpo, usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen *et al*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden formar complejos con un ión metálico incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Los radionúclidos pueden dirigirse mediante formación de complejos con los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención (Wu *et al*. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1137-1146).

Pueden prepararse reactivos enlazadores tales como DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobencil-DOTA) por la reacción de aminobencil-DOTA con ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con isopropilcloroformato (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy *et al* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1802-1807. Los reactivos de DOTA-maleimida reaccionan con los aminoácidos de cisteína libres de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína y proporcionan un ligando que forma complejo con metal en el anticuerpo (Lewis *et al* (1998) *Bioconj. Chem.* 9: 72-86). Están disponibles en el mercado reactivos marcadores de enlazadores quelantes tales como DOTA-NHS (1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético mono (N-hidroxisuccinimida éster) (Macrocyclics, Dallas, TX). La formación de imágenes dirigida a receptores con anticuerpos marcados con radionúclidos puede proporcionar un marcador de activación de la ruta por detección y cuantificación de acumulación progresiva de anticuerpos en tejido tumoral (Albert *et al* (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 1207-1210). Los radiometales conjugados pueden permanecer intracelulares después de la degradación lisosómica.

Se desvelan complejos quelantes metálicos adecuados como marcadores de anticuerpo para experimentos de formación de imágenes: documentos US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich *et al* (1983) *J. Immunol. Methods* 65: 147-157; Meares *et al* (1984) *Anal. Biochem.* 142: 68-78; Mirzadeh *et al* (1990) *Bioconjugate Chem.* 1: 59-65; Meares *et al* (1990) *J. Cancer* 1990, Supl. 10: 21-26; Izard *et al* (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 346-350; Nikula *et al* (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22: 387-90; Camera *et al* (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20: 955-62; Kukis *et al* (1998) *J. Nucl. Med.* 39: 2105-2110; Verel *et al* (2003) *J. Nucl. Med.* 44: 1663-1670; Camera *et al* (1994) *J. Nucl. Med.* 21: 640-646; Ruegg *et al* (1990) *Cancer Res.* 50: 4221-4226; Verel *et al* (2003) *J. Nucl. Med.* 44: 1663-1670; Lee *et al* (2001) *Cancer Res.* 61: 4474-4482; Mitchell, *et al* (2003) *J. Nucl. Med.* 44: 1105-1112; Kobayashi *et al* (1999) *Bioconjugate Chem.* 10: 103-111; Miederer *et al* (2004) *J. Nucl. Med.* 45: 129-137; DeNardo *et al* (1998) *Clinical Cancer Research* 4: 2483-90; Blend *et al* (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18: 355-363; Nikula *et al* (1999) *J. Nucl. Med.* 40: 166-76; Kobayashi *et al* (1998) *J. Nucl. Med.* 39: 829-36; Madirossian *et al* (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20: 65-74; Roselli *et al* (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14: 209-20.

(b) Marcadores fluorescentes tales como quelados de tierras raras (quelados de europio), tipos de fluoresceína incluyendo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; tipos de rodamina incluyendo TAMRA; dansilo; Lisamina; cianinas; ficoeritrinas; Texas Red; y análogos de los mismos. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con anticuerpos usando las técnicas desveladas en *Current Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente, por ejemplo. Los colorantes fluorescentes y reactivos marcadores fluorescentes incluyen los que están disponibles en el mercado de Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) y Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

(c) Están disponibles o se desvelan diversos marcadores de sustrato enzimático (documento US 4275149). La enzima cataliza en general una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse mediante espectrofotometría. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se han descrito anteriormente técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede después emitir luz que puede medirse (usando por ejemplo un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; documento US 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalacinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano rusticano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos en O'Sullivan *et al* (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166.

Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano rusticano (HRP) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en el que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

5 (ii) fosfatasa alcalina (AP) con paranitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, *p*-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

10 Están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para los expertos en la materia. Para una revisión general, véase documentos US 4275149 y US 4318980.

Un marcador puede conjugarse indirectamente con una cadena lateral de aminoácidos, una cadena lateral de aminoácidos activada, un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, y similares. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres categorías generales de marcadores mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a estreptavidina y de este modo el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Como alternativa, para conseguir conjugación indirecta del marcador con la variante polipeptídica, la variante polipeptídica se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con una variante polipeptídica anti hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti digoxina). Por lo tanto, puede conseguirse conjugación indirecta del marcador con la variante polipeptídica (Hermanson, G. (1996) en *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

25 El anticuerpo puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

Un marcador de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar un acontecimiento de unión o reconocimiento. Los anticuerpos marcados pueden detectar receptores de superficie celular. Otro uso para anticuerpos marcados de forma detectable es un método de inmunocaptura basado en perlas que comprende conjugar una perla con un anticuerpo marcador con fluorescencia y detectar una señal de fluorescencia tras la unión de un ligando. Metodologías de detección de unión similares utilizan el efecto de la resonancia de plasmón superficial (SPR) para medir y detectar las interacciones anticuerpo-antígeno.

35 Marcadores de detección tales como colorantes fluorescentes y colorantes quimioluminiscentes (Briggs *et al* (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1: 1051-1058) proporcionan una señal detectable y son generalmente aplicables para anticuerpos de marcaje, preferentemente con las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debería producir una señal muy alta con bajo fondo de modo que puedan detectarse sensiblemente cantidades pequeñas de anticuerpos en ensayos tanto sin células como basados en células; y (ii) el anticuerpo marcado debería ser fotoestable de modo que la señal fluorescente pueda observarse, controlarse y registrarse sin fotoblanqueo significativo. Para aplicaciones que implican la unión en superficie celular de anticuerpo marcado con membranas o superficies celulares, especialmente células vivas, los marcadores preferentemente (iii) tienen buena solubilidad en agua para conseguir sensibilidad de detección y concentración conjugada eficaz y (iv) no son tóxicos para células vivas de modo que no se alteren los procesos metabólicos normales de las células o provoquen muerte celular prematura.

La cuantificación directa de la intensidad de fluorescencia celular y enumeración de acontecimientos marcados con fluorescencia, por ejemplo unión en superficie celular de conjugados de péptido-colorante puede realizarse en un sistema (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza ensayos no reactivos, de mezcla y lectura con células vivas o perlas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4: 193-204). Los usos de anticuerpos marcados también incluyen ensayos de unión de receptor de superficie celular, ensayos de inmunocaptura, ensayos inmunoabsorbentes ligados a fluorescencia (FLISA), escisión de caspasa (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 618-23; documento US 6372907), apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184: 39-51) y ensayos citotóxicos. La tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorométricos puede usarse para identificar la regulación positiva o negativa por una molécula que se dirige a la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271: 143-51).

Los anticuerpos marcados son útiles como biomarcadores de formación de imágenes y sondas por los diversos métodos y técnicas de formación de imágenes biomédicas y moleculares tales como: (i) IRM (formación de imágenes por resonancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computarizada); (iii) SPECT (tomografía computarizada de emisión de un único fotón); (iv) PET (tomografía de emisión de positrones) Chen *et al* (2004) *Bioconjugate Chem.* 15: 41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonidos. La inmunoescintigrafía es

un procedimiento de formación de imágenes en el que los anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un paciente animal o humano y se toma una imagen de sitios en el cuerpo donde se localiza el anticuerpo (documento US 6528624). Los biomarcadores de formación de imágenes pueden medirse y evaluarse de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: el Tipo 0 son marcadores de historia natural de una enfermedad y se correlacionan longitudinalmente con índices clínicos conocidos, por ejemplo evaluación por IRM de la inflamación sinovial en artritis reumatoide; los marcadores de Tipo I capturan el efecto de una intervención de acuerdo con un mecanismo de acción, incluso aunque el mecanismo pueda no estar asociado con el resultado clínico; los marcadores de Tipo II actúan como criterios de valoración sustitutos en los que el cambio en, o señal de, el biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta diana, tal como erosión del hueso medida en artritis reumatoide por CT. Los biomarcadores de formación de imágenes pueden por lo tanto proporcionar información terapéutica farmacodinámica (PD) acerca de: (i) la expresión de una proteína diana, (ii) la unión de un producto terapéutico con la proteína diana, es decir selectividad, y (iii) datos farmacocinéticos de semivida y eliminación. Las ventajas de los biomarcadores de formación de imágenes *in vivo* en relación con biomarcadores basados en el laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, evaluación de cuerpo completo, cuantificable, dosificación repetida y evaluación, es decir múltiples puntos temporales, y potencialmente efectos transferibles de resultados preclínicos (animales pequeños) a clínicos (seres humanos). Para algunas aplicaciones, la formación de bioimágenes reemplaza o minimiza el número de experimentos animales en estudios preclínicos.

Se conocen bien métodos de marcaje de péptidos. Véase Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3: 2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1: 2; Glazer *et al* (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., Nueva York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, Nueva York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlín y Nueva York; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez *et al* (2004) *Chem. Eur. J.* 10: 1149-1155; Lewis *et al* (2001) *Bioconjugate Chem.* 12: 320-324; Li *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 110-115; Mier *et al* (2005) *Bioconjugate Chem.* 16: 240-237.

Se someten a transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) proteínas y péptidos marcados con dos restos, un indicador fluorescente e interruptor en suficiente proximidad. Los grupos indicadores son normalmente colorantes fluorescentes que se excitan por luz a una cierta longitud de onda y transfieren energía a un grupo aceptor, o interruptor, con el desplazamiento de Stokes apropiado para emisión a brillo máximo. Los colorantes fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad prolongada, tales como fluoresceína y rodamina y sus derivados. El indicador fluorescente puede estar parcial o significativamente inactivado por el resto interruptor en un péptido intacto. Tras la escisión del péptido por una peptidasa o proteasa, puede medirse un aumento detectable de la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248: 18-34).

Los anticuerpos marcados también pueden usarse como un agente de purificación de afinidad. En este procedimiento, el anticuerpo marcado se inmoviliza en una fase sólida tal como resina de Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno para purificar, y a continuación el soporte se lava con un disolvente adecuado que retirará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el antígeno para purificar, que está unido a la variante polipeptídica inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante polipeptídica.

Los reactivos de marcaje normalmente portan funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína para formar el anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un intermedio de enlazador-marcador, o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar el anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de reactivos de marcaje incluye: maleimida, haloacetilo, yodoacetamida succinimidil éster (por ejemplo, NHS, *N*-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriacínilo, pentafluorofenil éster, y fosoramidita, aunque también pueden usarse otros grupos funcionales.

Un grupo funcional reactivo ilustrativo es *N*-hidroxisuccinimidil éster (NHS) de un sustituyente de grupo carboxilo de un marcador detectable, por ejemplo biotina o un colorante fluorescente. El NHS éster del marcador puede preformarse, aislarse, purificarse y/o caracterizarse, o puede formarse *in situ* y hacerse reaccionar con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. Normalmente, la forma carboxílica del marcador se activa reaccionando con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, por ejemplo dicitohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida o un reactivo de uronio, por ejemplo TSTU (O-(*N*-succinimidil)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio tetrafluoroborato, HBTU (O-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato) o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato), un activador tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y *N*-hidroxisuccinimida para

proporcionar el NHS éster del marcador. En algunos casos el marcador y el anticuerpo puede acoplarse por activación *in situ* del marcador y reacción con el anticuerpo para formar el conjugado de marcador-anticuerpo en una etapa. Otros reactivos de activación y acoplamiento incluyen TBTU (2-(1H-benzotriazo-1-il)-1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametiluronio 2-fluoro-hexafluorofosfato), PiBOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina), DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitilen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol, y aril sulfonil haluros, por ejemplo cloruro de triisopropilbencenosulfonilo.

Compuestos de Fab-péptido de unión a albúmina

El anticuerpo puede fusionarse con una proteína de unión a albúmina. La unión de proteína de plasma puede ser un medio eficaz para mejorar las propiedades farmacocinéticas de moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína más abundante en plasma. Los péptidos de unión a albúmina de suero (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de proteínas de dominio activo fusionadas, incluyendo alteración de la captación, penetración y difusión tisular. Estos parámetros farmacodinámicos pueden modularse por selección específica de la secuencia peptídica de unión a albúmina de suero apropiada (documento US 20040001827). Se ha identificado una serie de péptidos de unión a albúmina por exploración de presentación de fagos (Dennis *et al.* (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277: 35035-35043; documento WO 01/45746). Los compuestos de la invención incluyen secuencias de ABP enseñadas por: (i) Dennis *et al.* (2002) J Biol Chem. 277: 35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 20040001827 en [0076] SEC ID N°: 9-22; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13. Se obtienen por ingeniería genética Fab-Unión a Albúmina (ABP) fusionando un péptido de unión a albúmina con el extremo C terminal de cadena pesada de Fab en una relación estequiométrica 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Se ha mostrado que la asociación de estos ABP-Fab con albúmina aumentó la semivida del anticuerpo en más de 25 veces en conejos y ratones. Los restos de Cys reactivos descritos anteriormente pueden por lo tanto introducirse en estos ABP-Fab y usarse para conjugación específica de sitio con fármacos citotóxicos seguido de estudios animales *in vivo*.

Las secuencias específicas de unión a albúmina ilustrativas incluyen, pero sin limitación, las secuencias de aminoácidos enumeradas en SEC ID N°: 42-46:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEC ID N°: 42
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEC ID N°: 43
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEC ID N°: 44
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEC ID N°: 45
DICLPRWGCLW	SEC ID N°: 46

Conjugados de anticuerpo-fármaco

En un aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados, o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado) como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención proporciona además métodos para usar los inmunoconjugados. Un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti CD22 unido covalentemente a un agente citotóxico como se define en las reivindicaciones.

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de Estados Unidos 4.975.278) permite el suministro dirigido del resto farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pp. 475-506). Se busca de este modo la eficacia máxima con toxicidad mínima. Se ha indicado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de

receptor de proteínas.

ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de enlazador de tiourea (Wiseman *et al* (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman *et al* (2002) Blood 99(12): 4336-42; Witzig *et al* (2002) J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63; Witzig *et al* (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra Linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (NHL), su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto de un anticuerpo de hu CD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patentes de Estados Unidos N° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). La cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto por el anticuerpo de huC242 unido mediante el enlazador de disulfuro SPP con el resto farmacológico maitansinoide, DM1, está avanzando hacia ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresen CanAg, tales como de colon, pancreáticos, gástricos y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo monoclonal anti antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido con el resto farmacológico maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpo monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Y de Lewis en carcinomas) y cAC10 (específicos de CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina *et al* (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Se describen en la presente memoria agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, neomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Se realizan conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al* (1987) Science, 238: 1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado en el carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (documento WO94/11026).

También se contemplan en la presente memoria conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad tóxica.

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado de la invención comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló en primer lugar del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos N° 3896111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos N° 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos farmacológicos de maitansinoide son restos farmacológicos atractivos en conjugados de fármaco y anticuerpos debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles a derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuros con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra una diversidad de líneas celulares tumorales.

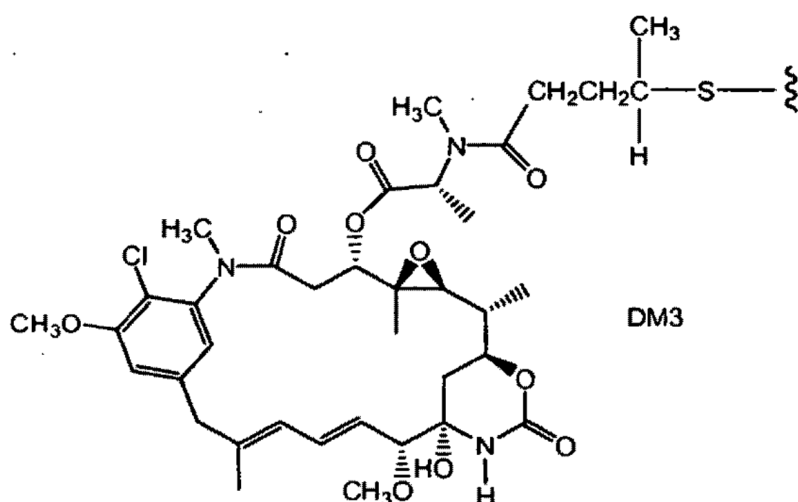
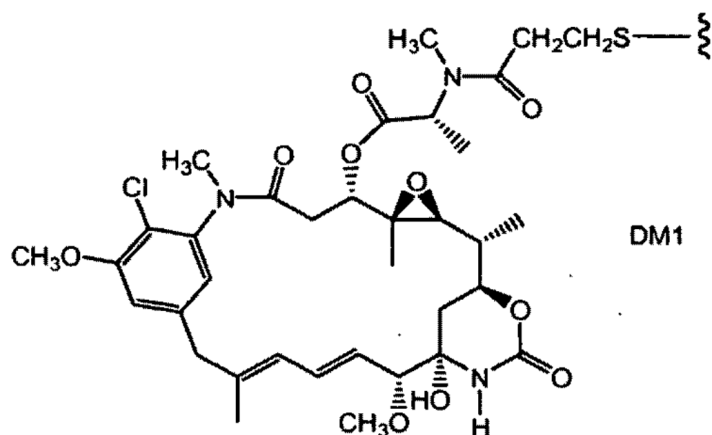
Se conocen bien en la técnica compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos farmacológicos maitansinoides, y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producirse usando

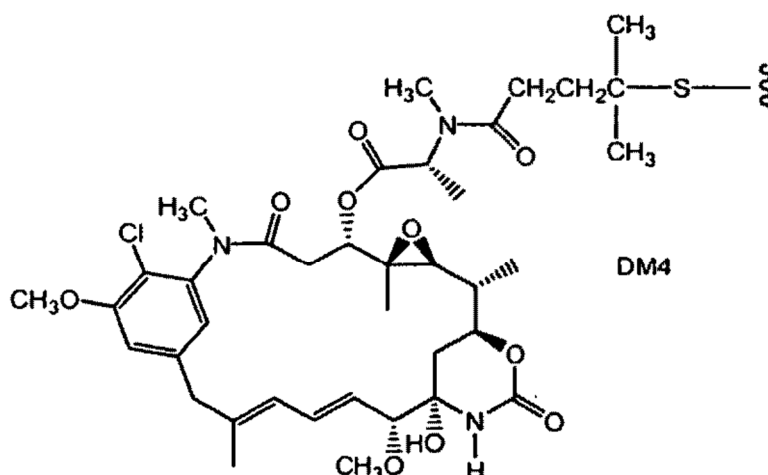
técnicas de ingeniería genética (véase Yu *et al* (2002) PNAS 99: 7968-7973), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

Los restos farmacológicos maitansinoides ilustrativos incluyen los que tienen un anillo aromático modificado tales como: C-19-decloro (documento US 4256746) (preparado por reducción con hidruro de aluminio de litio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-demetilo) +/-C-19-decloro (Patentes de Estados Unidos N° 4361650 y 4307016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o desfloración usando LAH); y C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo) y los que tienen modificaciones en otras posiciones.

Los restos farmacológicos maitansinoides ilustrativos también incluyen los que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (documento US 4424219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetilo (demetoxi/CH₂ OR) (documento US 4331598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (documento US 4450254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (documento US 4364866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (Patentes de Estados Unidos N° 4313946 y 4315929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-demetilo (Patentes de Estados Unidos N° 4362663 y 4322348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (documento US 4371533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

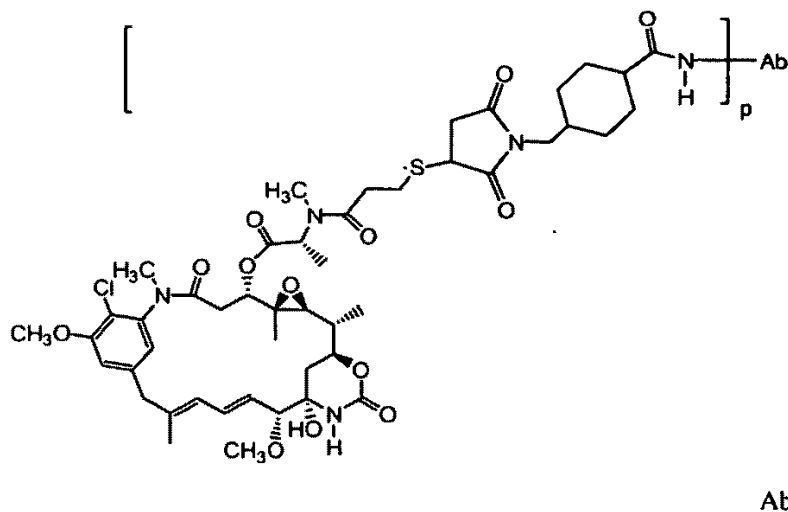
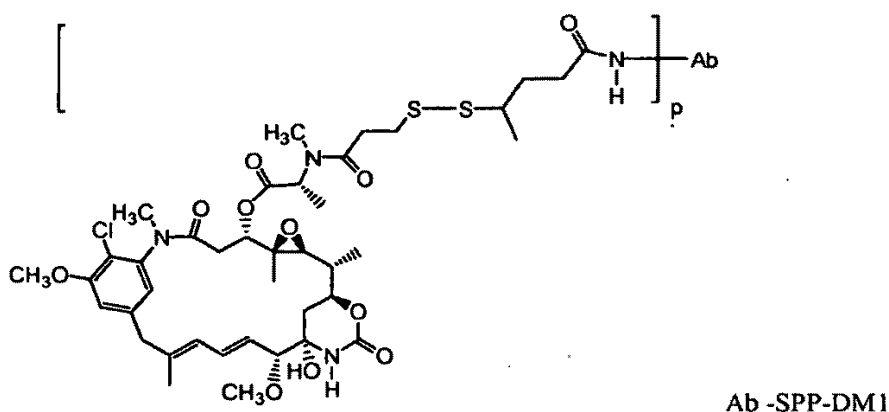
Las realizaciones ilustrativas de restos farmacológicos de maitansinoides incluyen: DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:



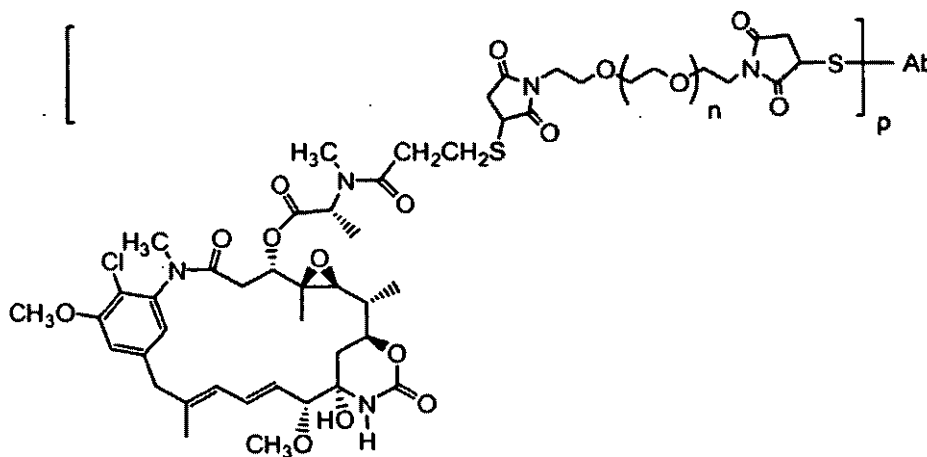


en las que la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco con un enlazador (L) de un conjugado de fármaco y anticuerpo. Se ha presentado HERCEPTIN® (trastuzumab, anticuerpo anti-HER2) unido por SMCC con DM1 (documento WO 2005/037992). Un conjugado de fármaco y anticuerpo de la presente invención puede prepararse de acuerdo con los procedimientos desvelados en la misma.

Otros conjugados de fármaco y anticuerpo de maitansinoides ilustrativos tienen las siguientes estructuras y abreviaturas, (en las que Ab es anticuerpo y p es de 1 a aproximadamente 8):



Los conjugados de fármaco y anticuerpo ilustrativos en los que DM1 está unido mediante un enlazador BMPEO con un grupo de tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



5 en la que Ab es anticuerpo; n es 0, 1, o 2; y p es 1, 2, 3, o 4.

Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos, y su uso terapéutico, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describió inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células cancerosas de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un enlace disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humanas, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humana SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacológico siguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Se preparan conjugados de maitansinoide-anticuerpo anti CD22 mediante enlace químico de un anticuerpo con una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica ni del anticuerpo ni de la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.208.020. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, incluso aunque se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente a las que se ha hecho referencia anteriormente en la presente memoria. Son maitansinoides preferidos maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 5208020, 6441163, o la Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992), y documento US 2005/0169933 A1. Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/141344, presentada el 31 de mayo de 2005, "Antibody Drug Conjugates and Methods". Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuros, grupos de tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas. Se describen y ejemplifican en la presente memoria grupos de enlace adicionales.

Pueden realizarse conjugados del anticuerpo y maitansinoide usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (*p*-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J.

173: 723-737 (1978)) y *N*-succinimidil-4-(2-piridil)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse a la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo del enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

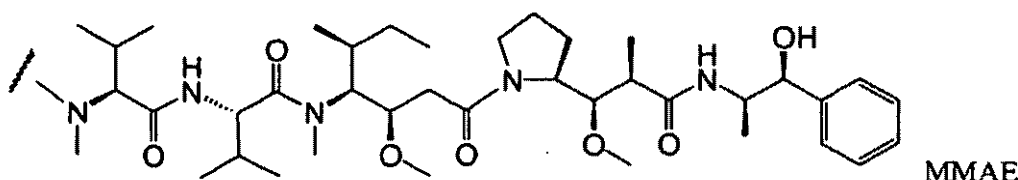
En una realización, el anticuerpo (de longitud completa o un fragmento) se conjuga con una o más moléculas de maitansinoide. En una realización del inmunoconjugado, el agente citotóxico D, es un maitansinoide DM1. En una realización del inmunoconjugado, el enlazador es SMCC. En una realización, el conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco es un anticuerpo anti CD22 como se desvela en la presente memoria al que está unido covalentemente el agente citotóxico DM1 mediante el enlazador SMCC.

Auristatinas y dolastatinas

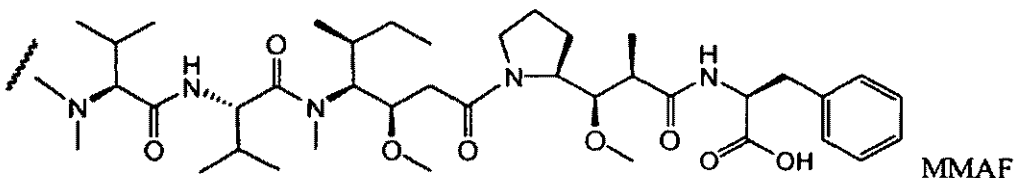
En algunas realizaciones, el inmunoconjugado de la invención comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos de dolastatina y derivados, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos N° 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965). El resto farmacológico de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo mediante el extremo N (amino) terminal o el extremo C (carboxilo) terminal del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina ilustrativas incluyen los restos farmacológicos de monometilauristatina unidos al extremo N DE y DF, desvelados en "Senter *et al*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Número de Resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

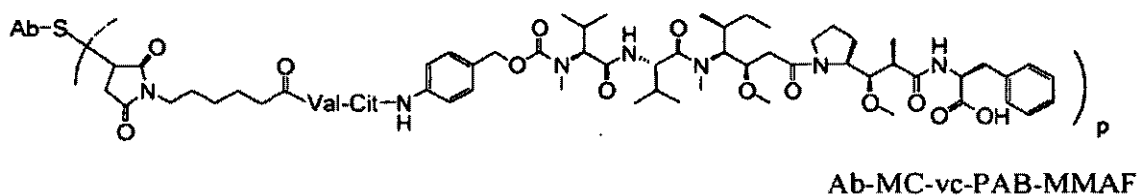
Una realización de auristatina ilustrativa es MMAE (en la que la línea ondulada indica la unión covalente con un enlazador (L) de un conjugado de fármaco y anticuerpo).

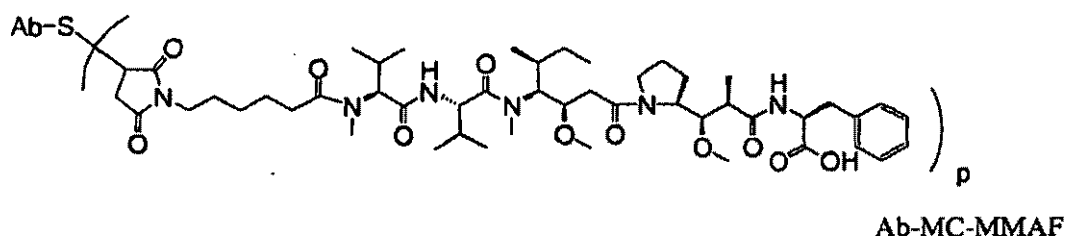
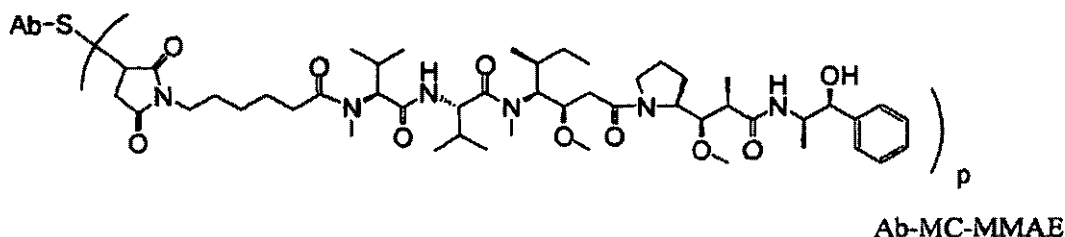
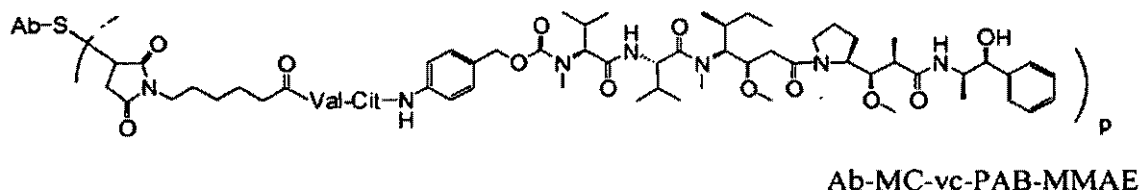


Otra realización de auristatina ilustrativa es MMAF, en la que la línea ondulada indica la unión covalente con un enlazador (L) de un conjugado de fármaco y anticuerpo (documento US 2005/0238649):



Realizaciones ilustrativas adicionales que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores (descritos adicionalmente en la presente memoria) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab significa anticuerpo y p es de 1 a aproximadamente 8):





Normalmente, pueden prepararse restos farmacológicos basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química peptídica. Los restos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: documentos US 5635483; US 5780588; Pettit *et al* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit *et al* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; Pettit, G. R., *et al*. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit *et al* (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863; y Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784.

Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunocóncugado de la invención comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase Patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ^1 , PSAG y θ^1 (Hinman *et al*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al*, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A diftérica, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, neomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

- 5 Para destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de espín para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como de nuevo yodo-123, yodo-131, iridio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

- Los marcadores radiactivos u otros pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse Itrio-90 mediante un resto de lisina. Puede usarse el método de IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

- Pueden realizarse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (*p*-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético marcado en el carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil en ácidos, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

- Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos). Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de fármaco y anticuerpo:

- En los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) de la invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en la presente memoria métodos adicionales para preparar ADC.

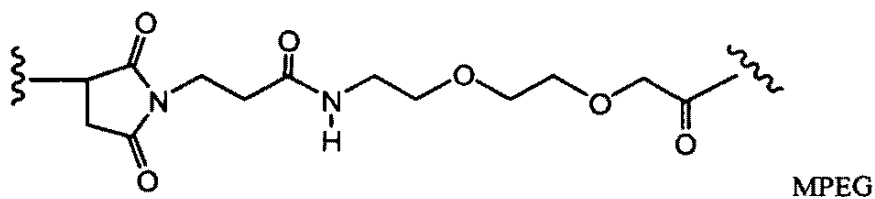
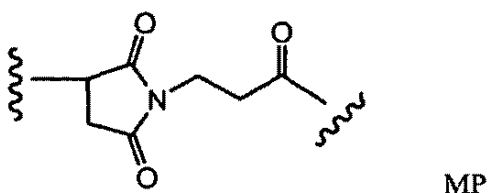
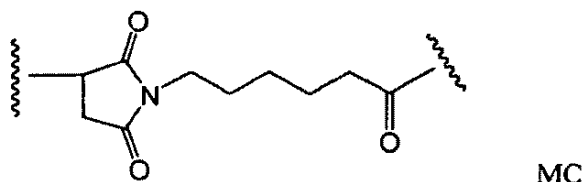
Ab-(L-D)_p Fórmula I

- El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ilustrativos incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), *p*-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), *N*-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), *N*-succinimidil 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y *N*-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la materia componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en la presente memoria.

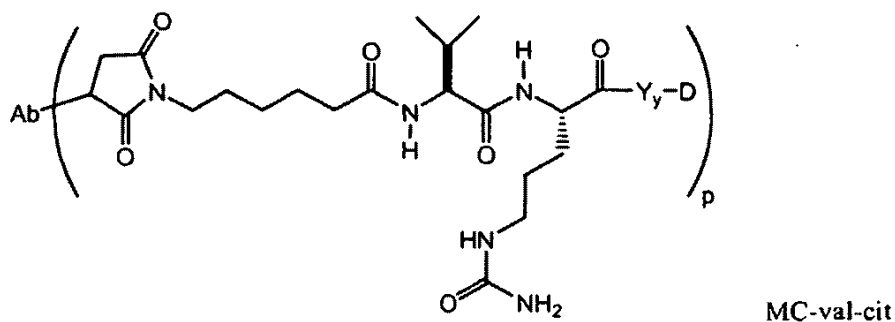
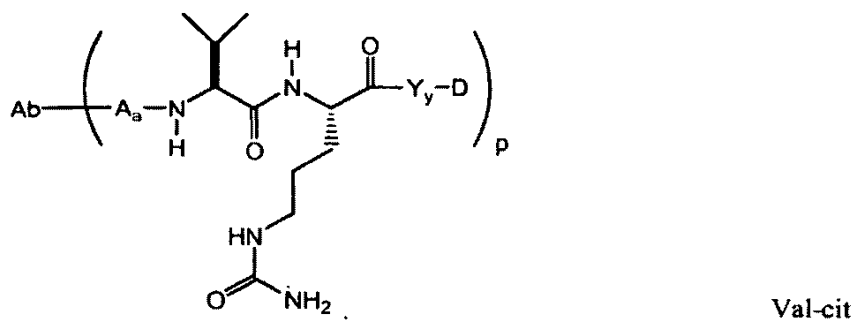
- En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes enlazadores de aminoácidos ilustrativos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ilustrativos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ilustrativos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos

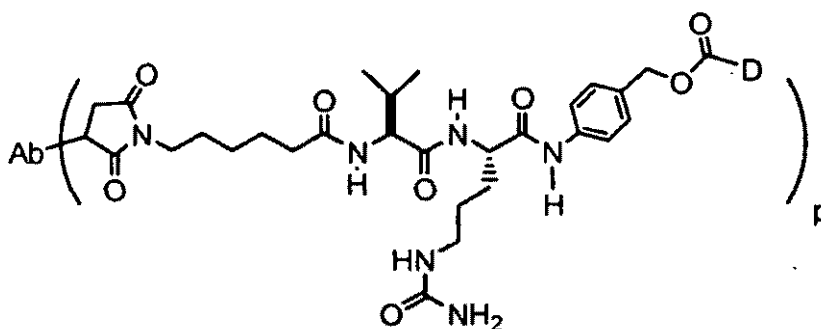
menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse componentes enlazadores de aminoácidos y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

- 5 Se muestran a continuación estructuras de componentes enlazadores ilustrativas (en las que la línea ondulada indica sitios de unión covalente con otros componentes del ADC):



- 10 Los componentes enlazadores ilustrativos adicionales y abreviaturas incluyen (en los que se representan el anticuerpo (Ab) y enlazador, y p es de 1 a aproximadamente 8):





MC-val-cit-PAB

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N terminales, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplos cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos de maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir enlaces de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que da como resultado la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos de tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

También pueden producirse conjugados farmacológicos de un anticuerpo de la invención mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos básicos Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N terminales pueden reaccionar con meta peryodato sódico lo que da como resultado producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidracina, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, hidracina carboxilato y arilhidracina capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos de maleimida.

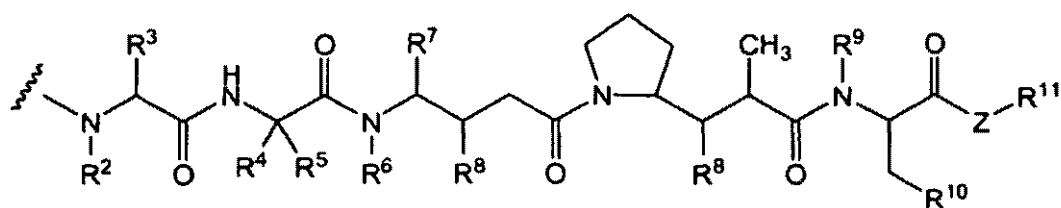
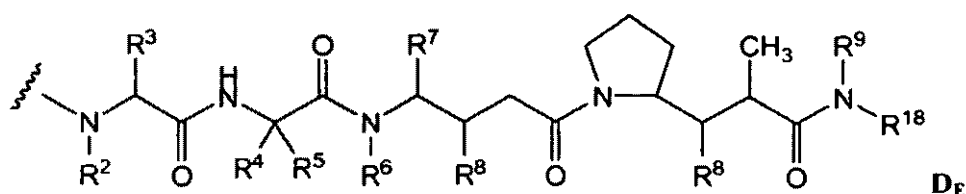
En otro aspecto más, el anticuerpo tiene uno o más restos de lisina que pueden modificarse químicamente para introducir uno o más grupos de sulfhidrilo. La unidad de anticuerpo se enlaza con la unidad de enlazador mediante el átomo de azufre del grupo de sulfhidrilo. Los reactivos que pueden usarse para modificar lisinas incluyen, pero sin limitación, *N*-succinimidil *S*-acetiltioacetato (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (Reactivo de Traut).

En otra realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos carbohidrato que pueden modificarse químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de anticuerpo se une a la Unidad Enlazadora, tal como la Unidad extensora mediante el átomo de azufre del grupo sulfhidrilo, como se desvela en la presente memoria.

En otra realización más, el anticuerpo puede tener uno o más grupos carbohidrato que pueden oxidarse para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo, Laguzza, *et al.*, J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un Sitio Reactivo en un Extensor. Los sitios reactivos en un Extensor que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidracina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de Unidades Farmacológicas se describen en Coligan *et al.*, Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), incorporada en la presente memoria por referencia.

Se encuentran métodos para la conjugación de restos farmacológicos-enlazador con proteínas dirigidas a células tales como anticuerpos, inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos, por ejemplo, en los documentos US 5.208.020; US 6.441.163; WO2005037992; WO2005081711; y WO2006/034488.

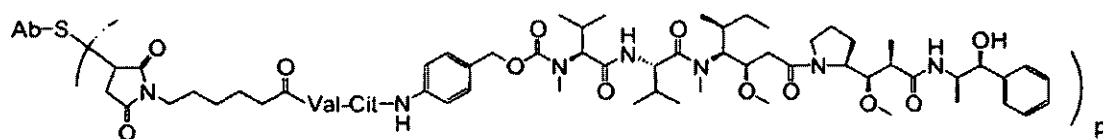
- 5 Como alternativa, puede realizarse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El tramo de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.
- 10 En otra realización más el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la predirección tumoral en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).
- 15 En una realización del immunoconjugado, el agente citotóxico, D, es una auristatina de fórmula D_E o D_F



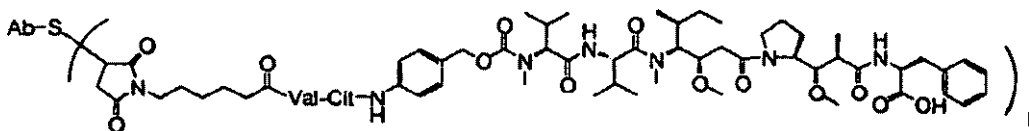
- 20 y en la que R² y R⁶ son cada una metilo, R³ y R⁴ son cada una isopropilo, R⁷ es *sec*-butilo, cada R⁸ se selecciona independientemente de CH₃, O-CH₃, OH y H; R⁹ es H; R¹⁰ es arilo; Z es -O- o -NH-; R¹¹ es H, alquilo C₁-C₈, o -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y (d) p varía de aproximadamente 1 a 8.

- 25 Las siguientes realizaciones se proporcionan además para cualquiera de los immunoconjugados anteriores. En una realización, un immunoconjugado tiene actividad de destrucción celular *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el enlazador se une al anticuerpo mediante un grupo tiol en el anticuerpo. En una realización, el enlazador es escindible por una proteasa. En una realización, el enlazador comprende un dipéptido val-cit. En una realización, el enlazador comprende una unidad de *p*-aminobencilo. En una realización, la unidad de *p*-aminobencilo está dispuesta entre el fármaco y un sitio de escisión de proteasa en el enlazador. En una realización, la unidad de *p*-aminobencilo es *p*-aminobenciloxicarbonilo (PAB). En una realización, el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo. En una realización, el 6-maleimidocaproilo está dispuesto entre el anticuerpo y un sitio de escisión de proteasa en el enlazador. Las realizaciones anteriores pueden realizarse individualmente o en cualquier combinación entre sí.
- 30

- 35 En una realización, el fármaco se selecciona de MMAE y MMAF. En una realización, el immunoconjugado tiene la fórmula



- 40 en la que Ab es cualquiera de los anticuerpos anti CD22 anteriores, S es un átomo de azufre y p varía de 2 a 5. En una realización, el immunoconjugado tiene la fórmula



en la que Ab es cualquiera de los anticuerpos anti CD22 anteriores, S es un átomo de azufre y p varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

Métodos de formación de imágenes de anticuerpos marcados:

En una realización de la invención, pueden marcarse anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína mediante el tiol de cisteína con radionúclidos, colorantes fluorescentes, restos de sustrato desencadenantes de bioluminiscencia, restos de sustrato desencadenantes de quimioluminiscencia, enzimas y otros marcadores de detección para experimentos de formación de imágenes con aplicaciones de diagnóstico, farmacodinámicas y terapéuticas. Generalmente, el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado, es decir "biomarcador" o "sonda" se administra por inyección, perfusión o ingestión oral a un organismo vivo, por ejemplo ser humano, roedor u otro animal pequeño, un órgano perfundido, o muestra tisular. La distribución de la sonda se detecta durante un periodo de tiempo y se representa por una imagen.

Artículos de fabricación:

Se describe un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, paquetes de blíster, etc. Los recipientes pueden estar formados de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que es eficaz para tratar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Al menos un agente activo en la composición es un ADC. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida, tal como cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Composiciones farmacéuticas:

En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunoconjugados anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la composición es para su uso en un método para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B en el que el método comprende administrar a un individuo la composición farmacéutica. En una realización, el trastorno proliferativo de linfocitos B se selecciona de linfoma, Linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto. En una realización, el trastorno proliferativo celular se asocia con expresión aumentada de CD22 en la superficie de una célula.

En un aspecto, se proporciona un inmunoconjugado de la invención para su uso en un método para inhibir la proliferación celular, en el que el método comprende exponer una célula a cualquiera de los inmunoconjugados anteriores en condiciones permisivas para unión del inmunoconjugado con CD22. En una realización, el linfocito B es una célula tumoral. En una realización, la célula tumoral es un linfocito B de un mamífero que experimenta o se sospecha que experimenta un trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado de linfoma, Linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto. La célula es de un xenoinjerto. En una realización, la exposición tiene lugar *in vitro*. En una realización, la exposición tiene lugar *in vivo*.

Se describe un método para usar el anticuerpo anti CD22 para ensayar CD22 soluble en suero en un mamífero que experimenta leucemia o linfoma para diagnosticar leucemia de linfocitos B o linfoma de linfocitos B, medir la progresión o regresión clínica de las enfermedades, o evaluar la carga tumoral o recaída. Dichos métodos se

desvelan en el documento US 20050244828 (Kreitman, R. J. *et al.*) usando un conjugado de anticuerpo anti CD22 RFB4 y toxina PE38 (fragmento 38 de exotoxina A de *Pseudomonas*) (véase R. J. *et al.*, NEJM 345: 241-247 (2001)).

5 Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1D: La **Figura 1A** es un diagrama de CD22 que indica los siete dominios de tipo inmunoglobulina del dominio extracelular de la isoforma beta. La isoforma alfa carece de los dominios 3 y 4. "TM" se refiere a dominio transmembrana. La **Figura 1B** representa la secuencia de aminoácidos de la forma beta de CD22 (SEC ID N°: 27). La forma alfa de CD22 carece de los aminoácidos mostrados en cursiva (que codifica los dominios 3 y 4 del dominio extracelular). El dominio extracelular de la forma madura de la proteína está subrayado (SEC ID N°: 28). Los aminoácidos 1-21 representan la secuencia señal escindida de la forma madura. La **Figura 1C** es la secuencia de aminoácidos de CD22alfa (SEC ID N°: 29). El ECD de CD22alfa está subrayado (SEC ID N°: 30). La **Figura 1D** es la secuencia de aminoácidos de CD22 de mono cynomolgus (cyno) (SEC ID N°: 31). Los primeros 19 aminoácidos de CD22 de cyno es la secuencia señal.

Figuras 2A-2B: La **Figura 2A** representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti CD22 10F4 murino de la invención (m10F4) alineada con el anticuerpo 10F4 humanizado versión 1 (h10F4v1) y alineada con la secuencia de subgrupo III humano. Las HVR están encuadradas (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3). Las secuencias que flanquean las HVR son las secuencias marco conservadas (FR-H1 a FR-H4). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican en torno a las HVR encuadradas. La **Figura 2B** representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti CD22 10F4 murino de la invención (m10F4) alineada con el anticuerpo 10F4 humanizado versión 1 (h10F4v1) y alineada con la secuencia kappa I humana. Las versiones 2 y 3 del anticuerpo 10F4 humanizado (h10F4v2 y h10F4v3) tienen las mismas secuencias de aminoácidos para la forma madura secretada. Los anticuerpos h10F4v2 y h10F4v3 difieren de h10F4v1 en el aminoácido 28 de la HVR-L1 (N28V). Las HVR están encuadradas. Las secuencias de FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 flanquean las HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican en torno a las HVR encuadradas.

Las **Figuras 3A y 3B** muestran secuencias marco conservadas consenso variables pesadas (VH) humanas de aceptores ilustrativas para su uso en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia como los siguientes, en los que la SEC ID N° de FR se enumeran en el orden FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4:

- marco consenso de subgrupo I de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 26, 47, 48, 7).
- marcos consenso de subgrupo I de VH humano "B", "C", y "D" menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 50, 51, 52, 7; SEC ID N°: 50, 51, 52, 7; y SEC ID N°: 50, 51, 53, 7).
- marco consenso de subgrupo II de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 54, 55, 56, 7).
- marcos consenso de subgrupo II de VH humano "B", "C", y "D" menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 57, 58, 56, 7; SEC ID N°: 57, 58, 59, 7; y SEC ID N°: 57, 58, 60, 7).
- marco consenso de subgrupo III de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 61, 62, 63, 7).
- marcos consenso de subgrupo III de VH humano "B", "C", y "D" menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 64, 65, 63, 7; SEC ID N°: 64, 65, 66, 7; y SEC ID N°: 64, 65, 67, 7).
- marco aceptor 1 de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 68, 62, 69, 7).
- marcos aceptores de VH humanos "B" y "C" menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 64, 65, 69, 7; y SEC ID N°: 64, 65, 70, 7).
- marco aceptor 2 de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 68, 62, 71, 7).
- marco aceptor 2 de VH humano "B", "C" y "D" menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 64, 65, 71, 7; SEC ID N°: 64, 65, 72, 7; y SEC ID N°: 64, 65, 73, 7).

Las **Figuras 4A y 4B** muestran secuencias marco conservadas consenso variables ligeras (VL) humanas aceptoras ilustrativas para su uso en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia como los siguientes:

- marco consenso de subgrupo I-1 kappa de VL humano (κ v1-1): SEC ID N°: 74, 75, 76, 77
- marco consenso de subgrupo I kappa de VL humano (κ v1): SEC ID N°: 74, 78, 76, 77

- marco consenso de subgrupo II kappa de VL humano (κ v2): SEC ID N°: 49, 79, 80, 77
- marco consenso de subgrupo III kappa de VL humano (κ v3): SEC ID N°: 81, 82, 83, 77
- 5 - marco consenso de subgrupo IV kappa de VL humano (κ v4): SEC ID N°: 84, 85, 86, 77

Figuras 5A y 5B: La **Figura 5A** representa alineamientos de secuencias de región Fc de IgG humana de secuencia nativa, humlgG1 (no alotipo A, SEC ID N°: 38; y alotipo A, en el que la secuencia de aminoácidos SREEM dentro de SEC ID N°: 38 se cambia a SRDEL), humlgG2 (SEC ID N°: 39), humlgG3 (SEC ID N°: 40) y humlgG4 (SEC ID N°: 41) con diferencias entre las secuencias marcadas con asteriscos. Los números encima de las secuencias representan el sistema de numeración EU. También se muestra una región constante kappa ilustrativa. La **Figura 5B** representa las secuencias de aminoácidos de longitud completa (regiones variables y constantes) de las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo anti CD22 humanizado 10F4v2, isotipo IgG1. Las partes subrayadas representan los dominios constantes.

Las **Figuras 6A-6D** muestran resultados de ensayos que miden diversos determinantes de la eficacia de ADC CD22 en líneas celulares de linfoma. La **Figura 6A** indica que los niveles de CD22 en superficie celular mayores se correlacionan con una menor CI50 anti CD22-MCC-DM1 (mayor eficacia). La **Figura 6B** indica que la mayor internalización de anti CD22-MCC-DM1 se correlaciona con menor CI50 anti CD22-MCC-DM1. La **Figura 6C** indica que el aumento de la sensibilidad intrínseca de células a fármaco libre se correlaciona con menor CI50 anti CD22-MCC-DM1. La **Figura 6D** es una microfotografía que muestra la internalización de anticuerpo anti CD22 marcado con fluorescencia después de la unión con CD22 en la superficie celular.

Figuras 7A - 7B: La **Figura 7A** es un gráfico de reducción del volumen tumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto que muestra que la administración de anticuerpo anti CD22 mu10F4-smcc-DM1 y hu10F4v1-smcc-DM1 a ratones SCID que tienen tumores de linfocitos B humanos redujo significativamente el volumen tumoral. La carga farmacológica fue de aproximadamente 4 y 4,6, véase Tabla 4. La **Figura 7B** es un gráfico de un estudio similar, pero la carga farmacológica fue ligeramente menor a aproximadamente 2,9 y 3,0 (véase Tabla 5) y la eficacia de mu10F4-smcc-DM1 y hu10F4v2-smcc-DM1 se comparó con anticuerpo de control y mu10F4 no conjugado. La **Figura 7C** es un gráfico de la reducción tumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto en el que se administró anti CD22-spp-DM1 como se indica en la Tabla 6.

Figuras 8A y 8B: La **Figura 8A** es un gráfico de anticuerpos anti CD22 5E8.1.8-smcc-DM1 y RFB4-smcc-DM1 administrados a xenoinjertos de células Ramos. La **Figura 8B** es un gráfico de anticuerpos anti CD22 5E8.1.8-smcc-DM1 y RFB4-smcc-DM1 administrados a xenoinjertos de BJAB-luc.

La **Figura 9** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral a lo largo del tiempo después de la administración de anti CD22(RFB4)-smcc-DM1 a cargas farmacológicas bajas, medias y altas.

La **Figura 10** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral a lo largo del tiempo después de la administración de anti CD22 (RFB4)-MC-vcPAB-MMAF o anti CD22 (RFB4)-MC-MMAF en xenoinjertos de Ramos.

La **Figura 11** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral a lo largo del tiempo después de la administración de anti CD22 (RFB4)-smcc-DM1 o -MCvcPAB-MMAE.

La **Figura 12** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral a lo largo del tiempo después de la administración de variantes anti CD22 10F4 humanizadas como inmunoconjugados de MMAF o DM1 como se desvela en la Tabla 12.

Las **Figuras 13A-13C** son gráficos que muestran el efecto relativo en el volumen tumoral a lo largo del tiempo después de la administración de anti CD22-smcc-DM1 o anti CD22-MC-MMAF en diferentes modelos de xenoinjerto de linfocitos B: SuDHL-4 (Figura 13A), DoHH2 (Figura 13B) y Granta-519 (Figura 13C).

La **Figura 14** muestra diagramas de dominios CD22 suprimidos para mapeo de epítomos como se describe en los Ejemplos. Los dominios se numeran 1-7. "TM" se refiere a dominio transmembrana.

La **Figura 15** muestra representaciones de conjugados de fármaco y anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína (ADC) en los que un resto farmacológico está unido a un grupo de cisteína introducido por ingeniería genética en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).

La **Figura 16** muestra las etapas de: (i) reducir aductos de disulfuro de cisteína y disulfuros intercatenarios e intracatenarios en un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína (TioMab) con agente reductor TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina); (ii) oxidar parcialmente, es decir reoxidación para reformar los disulfuros intercatenarios e intracatenarios, con dhAA (ácido deshidroascórbico); y (iii) conjugación

del anticuerpo reoxidado con un intermedio de fármaco-enlazador para formar un conjugado de fármaco de anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína (ADC).

Las **Figuras 17A-17C** representan las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína anti CD22 de la invención en los que la cadena ligera o la cadena pesada o la región Fc está alterada para introducir por ingeniería genética una cisteína en posiciones de aminoácidos seleccionadas. La Figura 17A representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la variante 10F4 anti CD22 en la que una valina en la posición de Kabat 205 (posición secuencial Valina 210) está alterada a una Cisteína. La Figura 17B representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de variante 10F4 anti CD22 en la que una Alanina en la posición EU 118 (posición secuencial de Alina 121) está alterada a una Cisteína. La Figura 17C representa la secuencia de aminoácidos de la región Fc de variante 10F4 anti CD22 en la que una Serina en la posición EU 400 (posición secuencial Serina 403) está alterada a una cisteína. En cada Figura, el aminoácido alterado se muestra en negrita con doble subrayado. El subrayado individual indica regiones constantes. Las regiones variables no están subrayadas.

Las **Figuras 18A-18E** son representaciones de FACS que indican que la unión de conjugados farmacológicos de TioMab anti CD22 (TDC) de la invención que se unen a CD22 expresado en la superficie de células BJAB-lucs es similar para variantes de TioMab LC, HC y Fc así como para los diferentes conjugados farmacológicos mostrados.

La **Figura 19** es un gráfico que representa cambios en el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en un modelo de xenoinjerto tratado con diferentes TDC anti CD22, que variaron en posición de la cisteína introducida por ingeniería genética (LC, HC o Fc) y/o por conjugado farmacológico (MMAF o MMAE). Los modelos de xenoinjerto tratados con TDC anti CD22 10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAE y anti CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAE mostraron una reducción en el volumen tumoral durante el estudio.

La **Figura 20A** es un gráfico que representa cambios en el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en un xenoinjerto de Granta-519 de linfoma de células del manto humano en ratones SCID CB17 tratados con TDC anti CD22 A118C de cadena pesada conjugados con diferentes restos farmacológicos enlazadores y/o administrados a diferentes dosis como se muestra. El TDC anti CD22 10F4-HC(A18C)-MCvcPAB-MMAE parecía ser el más eficaz de los agentes de ensayo de este experimento. La Figura 20B es un gráfico que representa cambios en el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en un xenoinjerto de DOHH2 de linfoma folicular en ratones SCID CB 17 tratados con los mismos TDC anti CD22 A118C de cadena pesada, pero a mayores dosis. El TDC anti CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE parecía ser el más eficaz de los agentes de ensayo en este experimento. La **Figura 20C** es una representación del porcentaje de cambio de peso en los ratones del estudio de xenoinjerto de DOHH2 que muestra que no hubo cambios significativos en el peso durante los primeros 14 días del estudio.

Las **Figuras 21A y 21 B** son gráficos de barras que muestran cambios en AST (aspartato aminotransferasa) en suero (**Figura 21A**) y neutrófilos en suero (**Figura 21B**) los Días 0 y 5 en los que se administró ADC que comprendía un enlazador escindible y no escindible.

Las **Figuras 22A y 22B** son gráficos que muestran el agotamiento de linfocitos B periféricos (células CD20⁺) en mono cynomolgus dosificados con 10, 20 y 30 mg/kg de MMAF anti CD22 (**Figura 22A**) y DM1 anti CD22 (**Figura 22B**).

Las **Figuras 23A y 23B** son gráficos que no muestran cambios significativos en linfocitos CD4⁺ a 10, 20 y 30 mg/kg de MMAF anti CD22 (**Figura 23A**) y DM1 anti CD22 (**Figura 23B**).

Las **Figuras 24A y 24B** muestran muestras histológicas de tejido de amígdalas de mono cynomolgus en las que el agotamiento de linfocitos B del centro germinal, evidente en el control de vehículo (**Figura 24A**), está agotado en una muestra de amígdala de un animal al que se dosificó hu10F4v3-SMCC-DM 1 10 mg/kg.

La **Figura 25A** es un diagrama que indica las regiones de folículo del bazo de las que se tomaron muestras tisulares para un estudio en el que se mostró que los ADC anti CD22 evitan los linfocitos B en tejido en reposo en monos cynomolgus. Las células en división en el centro germinal de folículo del bazo de cyno se agotaron en células germinales en división de bazos de cyno de animales dosificados con hu10F4v3-MC-MMAF a 10 mg/kg (**Figuras 25B y 25C**). Los linfocitos B vírgenes no en división no se agotaron en las mismas condiciones (**Figuras 25D y 25E**).

Descripción detallada de realizaciones de la invención

Se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a CD22. Se proporcionan adicionalmente inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti CD22. Se proporcionan adicionalmente anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína e inmunoconjugados de los mismos. Son útiles anticuerpos e inmunoconjugados de la invención, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con expresión alterada, por ejemplo, expresión aumentada, de CD22. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la

invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo celular, tal como un tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de CD22, por ejemplo, CD22 expresado en la superficie celular.

Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti CD22. Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti CD22, y se proporcionan células hospedadoras que comprenden dichos vectores. También se proporcionan composiciones, incluyendo formulaciones farmacéuticas, que comprenden uno cualquiera o más de los polinucleótidos, anticuerpos anti CD22 o inmunoconjugados de la invención.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o referidos en la presente memoria se entienden generalmente bien y se emplean habitualmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): Pcr 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, y Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

Definiciones y abreviaturas

Definiciones

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas realizaciones, a más del 99 % en peso; (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, usando, por ejemplo, tinción de azul de Coomassie o plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se preparará anticuerpo aislado en al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que está separada de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que se asocia habitualmente, por ejemplo, en su ambiente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos 95 % en peso, o al menos 98 % en peso de la muestra en la que está contenida.

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en la presente memoria, indica un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 % y/o menos de aproximadamente 10 % en función del valor de referencia/comparador.

La frase “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se usa en la presente memoria, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10 %, mayor de aproximadamente 20 %, mayor de aproximadamente 30 %, mayor de aproximadamente 40 % y/o mayor de aproximadamente 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

El término “vector”, como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria “vectores de expresión recombinantes” o simplemente “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico” como se usan en la presente memoria de forma intercambiable, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa o por una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de nucleótidos puede transmitirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una modificación o modificaciones realizadas después de la síntesis, tales como conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “recubrimientos”, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las de enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pili-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditiato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente memoria incluyendo ARN y ADN.

“Oligonucleótido”, como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que son generalmente, pero no necesariamente, de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna

sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNAS-TAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines de la presente memoria, sin embargo, se generan valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se autorizó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D. C., 20559, en la que está registrada con el N° de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplee ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede describirse como alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 por la fracción X/Y

en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A y B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B y A. A no ser que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

Un "marcador de superficie de linfocitos B" o "antígeno de superficie de linfocitos B" en la presente memoria es un antígeno expresado en la superficie de un linfocito B al que puede dirigirse un antagonista que se une al mismo, incluyendo pero sin limitación, anticuerpos para un antígeno de superficie de linfocitos B o una forma soluble de un antígeno de superficie de linfocitos B capaz de antagonizar la unión de un ligando con el antígeno de linfocitos B de origen natural. Los marcadores de superficie de linfocitos B ilustrativos incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para descripciones, véase The Leukocyte Antigen Facts Book, 2ª Edición. 1997, ed. Barclay *et al.* Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores de superficie de linfocitos B incluyen RP105, FcRH2, CR2 de linfocitos B, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btlig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA y 239287. El marcador de superficie de linfocitos B de interés particular se expresa preferentemente en linfocitos B en comparación con otros tejidos distintos de linfocitos B de un mamífero y puede expresarse tanto en linfocitos B precursores como en linfocitos B maduros.

El término "CD22", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier CD22 nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo seres humanos, mono cynomolgus (cyno)) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a no ser que se indique de otro modo. El término abarca CD22 no procesados, "de longitud completa" así como cualquier forma de CD22 que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de CD22, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. La isoforma principal de CD22 (CD22beta) comprende 847 aminoácidos y siete regiones de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular (véase Wilson, G. L. *et al.*, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)). Un isoforma menor, CD22alfa, comprende 647 aminoácidos y carece de dominios 3 y 4 de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular (véase Stamenkovic, L y Seed, B., Nature 345: 74-77 (1990)) y Wilson *et al.* (1991), mencionado anteriormente). La secuencia de aminoácidos de CD22 beta se representa en la Figura 1B en la que la parte subrayada es el dominio extracelular (ECD) y la parte en cursiva indica los aminoácidos ausentes de la secuencia de dominio extracelular de CD22 alfa. La Figura 1C representa la secuencia de aminoácidos de CD22alfa en la que el ECD está subrayado. La secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 al aminoácido 21 representa la secuencia señal escindida de la forma madura de la proteína. En una realización, CD22 se expresa en la superficie celular, tal como la superficie de un linfocito B normal o un linfocito B tumoral. La Figura 1D representa la secuencia de aminoácidos de CD22 de mono cynomolgus.

Los "Anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión con un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que generalmente carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a mayores niveles

por mielomas.

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan de forma intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe en más detalle en la presente memoria). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

- 10 La expresión “anticuerpo anti CD22” o “un anticuerpo que se une a CD22” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD22 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a CD22. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti CD22 con una proteína no CD22, no relacionada, es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo con CD22 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a CD22 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \text{ mM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti CD22 se une a un epítipo de CD22 que está conservado entre CD22 de diferentes especies.

- 20 La “región variable” o “dominio variable” de un anticuerpo se refiere a los dominios amino terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse “VH”. El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse “VL”. Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

- 25 El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren en gran medida en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan las regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras tales como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

- 40 Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

- 45 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.* Cellular and Mol. Immunology, 4^a ed. (2000). Un anticuerpo puede ser una parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

- 55 Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se usan de forma intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se definen posteriormente. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

- 60 Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, en la que la parte conserva al menos una, y hasta la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y de este modo conserva la capacidad para unirse a antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión de FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión del complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender una rama de unión a antígeno

ligada con una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La digestión con papaina de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie de Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de ligera en asociación estrecha, no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de ligera pueden estar unidos covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga de la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo de tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO93/1161; Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un procedimiento que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a una sola diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinantes. Debería entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar su afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por una diversidad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,

2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), tecnología de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; Marks *et al.*, Bio. Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que se reemplazan restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR, *framework region*) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha realizado usando cualquiera de las técnicas para realizar anticuerpos humanos como se desvela en la presente memoria. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

La expresión “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se usa en la presente memoria, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis regiones hipervariables, y se cree que H3 en particular desempeña un papel exclusivo al conferir excelente especificidad a los anticuerpos. Xu *et al.* (2000) Immunity 13: 37-45; Johnson y Wu (2003) en Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural, que constan solo de una cadena pesada, son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Hamers-Casterman *et al.* (1993) Nature 363: 446-448; Sheriff *et al.* (1996) Nature Struct. Biol. 3: 733-736.

Varias delineaciones de región hipervariable están en uso y se incluyen en la presente memoria. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere por otro lado a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. A continuación se indican los restos de cada una de estas regiones hipervariables.

Bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto
----	----	----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32
	(Numeración de Kabat)		H30-H35B
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
	(Numeración de Chothia)		H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101
			H47-H58
			H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” como las siguientes: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones. Las regiones hipervariables HVR-H1 y HVR-H2 de los anticuerpos anti-CD22 10F4 de la invención son H26-H35 y H49-H65 usando la numeración de Kabat.

Los restos “marco” o “FR” son los restos del dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en la presente memoria.

La expresión “numeración de restos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de posición de aminoácidos como en Kabat”, y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener pocos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un solo aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada. La numeración de restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”.

Un “aminoácido de cisteína libre” se refiere a un resto aminoácido de cisteína que se ha modificado por ingeniería genética en un anticuerpo parental, que tiene un grupo tiol (-SH) funcional, y que no se empareja como, o es parte de otro modo de, un enlace disulfuro intramolecular o intermolecular.

La expresión “valor de reactividad de tiol” es una caracterización cuantitativa de la reactividad de aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad de tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que reacciona con un reactivo sensible a tiol, y convertido a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que reacciona en rendimiento del 100% con un reactivo sensible a tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, para formar un anticuerpo marcado con biotina, tiene un valor de reactividad de tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína modificado por ingeniería genética en el mismo o diferente anticuerpo parental que reacciona en rendimiento del 80% con un reactivo sensible a tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína modificado por ingeniería genética en el mismo o diferente anticuerpo parental que no consigue reaccionar en absoluto con un reactivo sensible a tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0. La determinación del valor de reactividad de tiol de una cisteína particular puede realizarse por un ensayo de ELISA, espectroscopia de masas, cromatografía líquida, autorradiografía u otros ensayos analíticos cuantitativos. Los reactivos sensibles a tiol que permiten la captura del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y la comparación y cuantificación de la reactividad de cisteína incluyen biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamida-3,6-dioxaoctaindiamina, Oda *et al* (2001) Nature Biotechnology 19: 379-382, Pierce Biotechnology, Inc.), Biotina-BMCC, PEO-Yodoacetil Biotina, Yodoacetil-LC-Biotina y Biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) y N α -(3-maleimidopropionil)biotina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para biotilación, reactivos enlazadores bifuncionales y multifuncionales incluyen Molecular Probes, Eugene, OR, and Sigma, St. Louis, MO.

Un “anticuerpo parental” es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más restos de aminoácidos se reemplazan por uno o más restos de cisteína. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia nativa o de tipo silvestre. El anticuerpo parental puede tener modificaciones de secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones) en relación con otras formas nativas, de tipo silvestre o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo parental puede dirigirse contra un antígeno diana de interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan anticuerpos dirigidos contra

antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolípidos asociados a tumor; véase el documento US 5091178).

En la presente memoria se usan las siguientes abreviaturas y tienen las definiciones indicadas: BME es beta-mercaptoetanol, Boc es N-(t-butoxicarbonilo), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanoico), dap es dolaproína, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es N,N-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es N,N-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, EN-EM es espectrometría de masas por electronebulización, EtOAc es etil acetato, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida a alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1S, 2R)-(+)-norefedrina, PAB es *p*-aminobencilcarbamoilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es bromo tris-pirolidin fosfonio hexafluorofosfato, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describen la maduración de afinidad cambiando de sitio los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o restos marco se describe por: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un “anticuerpo agonista”, como se usa en la presente memoria, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varía con el isotipo del anticuerpo. Como ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión del receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

“Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que van a identificarse en el futuro, se incluyen en el término “FcR” de la presente memoria.

La expresión “receptor de Fc” o “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión con FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). Puede ensayarse la unión con FcRn humano *in vivo* y semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o en líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos variantes de Fc.

El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase, también, Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan una función o funciones efectoras de ADCC. Como ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruya la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337 o en la Patente de Estados Unidos de Presta N° 6.737.056. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno afin. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como describen Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

En la Patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642 se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos en la región Fc alteradas y con mayor o menor capacidad de unión a C1q. Véase, también, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

La expresión "polipéptido que comprende región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o por modificación genética recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

Un "marco humano aceptor" para los fines de la presente memoria es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco VL o VH derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando están presentes cambios de aminoácidos preexistentes en una VH, preferentemente esos cambios se producen solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el marco humano aceptor VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana VL o secuencia marco consenso humana.

Un "marco consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la sección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, para la VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

Un "marco consenso de subgrupo III VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, la secuencia de aminoácidos de marco consenso de subgrupo III VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, SEC ID N° :1)-HVR-H1-
WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, SEC ID N° :3)-HVR-H2-
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (FR-H3, SEC ID N° :5)-HVR-H3-
WGQGTLLTVSS (FR-H4, SEC ID N° :7).

Un "marco consenso de subgrupo I VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, la

secuencia de aminoácidos marco consenso de subgrupo I VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, SEC ID N°: 8)-HVR-L1-10 WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, SEC ID N°: 11)-
HVR-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (FR-L3, SEC ID N°: 13)-HVR-L3-FGQGTKVEIK (FRL4,
SEC ID N°: 15).

La "secuencia señal de secreción" o "secuencia señal" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal corto que puede usarse para dirigir una proteína de nueva síntesis de interés 15 a través de una membrana celular, habitualmente la membrana interna o las membranas tanto interna como externa de procariontes. Como tal, la proteína de interés, tal como el polipéptido de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se segrega al

periplasma de las células hospedadoras procariontes o al medio de cultivo. El péptido señal codificado por la secuencia señal de secreción puede ser endógeno de las células hospedadoras, o puede ser exógeno, incluyendo péptidos señal 20 nativos del polipéptido a expresar. Las secuencias señal de secreción están normalmente presentes en el extremo amino terminal de un polipéptido a expresar, y normalmente se eliminan enzimáticamente entre la biosíntesis y la secreción del polipéptido del citoplasma. Por lo tanto, el péptido señal habitualmente no está presente en un producto de proteína madura.

La "afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de 25 interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique de otro modo, como se usa en la presente memoria, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca, que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por 30 métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos 73 de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

En una realización, la "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con la presente invención se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como describe el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (125I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de microtitulación (Dynex) durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino 2% (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N° 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599).

El Fab de interés se incuba después durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución se retira después y la placa se lava ocho veces con Tween-20 0,1% en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de producto de centelleo (MicroScint-20; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual a 20% de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la Kd o valor Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas con antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se

- inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05% (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) usando un modelo de unión de Langmuir individual sencillo (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la relación koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Si la velocidad de asociación supera 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de interrupción fluorescente que mide el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.
- 15 También puede determinarse una “velocidad de asociación”, “tasa de asociación” o “kon” de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).
- 20 Un “trastorno” es cualquiera afección o enfermedad que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye de trastornos crónicos y agudos incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en la presente memoria incluyen afecciones cancerosas tales como trastornos proliferativos de linfocitos B y/o tumores de linfocitos B, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recurrente, NHL indolente recurrente, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.
- 25 Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.
- 30 “Tumor”, como se usa en la presente memoria, se refiere a todos los crecimientos y proliferaciones celulares neoplásicos, bien malignos o benignos, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Las expresiones “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente exclusivas como se indica en la presente memoria.
- 35 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular mal regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, trastornos proliferativos de linfocitos B. El trastorno proliferativo de linfocitos B se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recurrente, NHL indolente recurrente, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto. Otras afecciones cancerosas incluyen, por ejemplo, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer microcítico pulmonar, cáncer no microcítico pulmonar, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- 40 Un “tumor maligno de linfocitos B” en la presente memoria incluye linfoma no Hodgkin (NHL), que incluye NHL de grado bajo/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL celular no escindido pequeño de grado alto, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con SIDA y Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no Hodgkin (NHL), enfermedad de Hodgkin predominante en linfocitos (LPHD), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfocítica crónica (CLL), NHL indolente incluyendo NHL indolente recurrente y NHL indolente resistente a rituximab; leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), tricoleucemia, leucemia mieloblástica crónica, linfoma de células del manto; y otros tumores malignos hematológicos. Dichos tumores malignos pueden tratarse con anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie de linfocitos B, tales como CD22. Se contempla en la presente memoria que dichas enfermedades se tratan por administración de un anticuerpo dirigido contra un marcador de superficie de linfocitos B, tal como CD22, e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado (“desnudo”) o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico como se desvela en la presente memoria. También se contempla en la presente memoria que dichas enfermedades se tratan por terapia de combinación incluyendo un anticuerpo anti CD22 o conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 de la invención en combinación con otro anticuerpo o conjugado de fármaco y anticuerpo, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie. En el método de tratamiento ilustrativo de la invención, un anticuerpo anti CD22 de la invención se administra en
- 65

combinación con un anticuerpo anti CD20, inmunoglobulina o fragmento de unión a CD20 del mismo, bien juntos o bien secuencialmente. El anticuerpo anti CD20 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de fármaco y anticuerpo. En una realización de la terapia de combinación, el anticuerpo anti CD22 es un anticuerpo de la presente invención y el anticuerpo anti CD20 es Rituxan® (rituximab).

La expresión “linfoma no Hodgkin” o “NHL”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un cáncer del sistema linfático distinto de linfoma de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin pueden distinguirse generalmente de linfomas no Hodgkin por la presencia de células Reed-Sternberg en linfomas de Hodgkin y la ausencia de dichas células en linfomas no Hodgkin. Los ejemplos de linfomas no Hodgkin incluidos en la expresión como se usa en la presente memoria incluyen cualquiera que se identificaría como tal por un experto en la materia (por ejemplo un oncólogo o patólogo) de acuerdo con los esquemas de clasificación conocidos en la técnica, tales como el esquema de Linfoma Europeo-Americano Revisado (REAL) como se describe en Color Atlas of Clinical Hematology (3ª edición), A. Víctor Hoffbrand y John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Véase, en particular, las listas en las Figuras 11.57, 11.58 y 11.59. Más ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, NHL recidivante o refractario, NHL de grado bajo de primera línea, NHL de Estados III/IV, NHL resistente a quimioterapia, leucemia y/o linfoma linfoblástico de precursor B, linfoma linfocítico pequeño, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de linfocitos B de zona marginal, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma de MALT zona marginal extranodal, linfoma de zona marginal nodal, tricoleucemia, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma folicular/de grado bajo, NHL folicular/de grado intermedio, linfoma de células del manto, linfoma de centro folicular (folicular), NHL difuso de grado intermedio, linfoma de linfocitos B grande difuso, NHL agresivo (incluyendo NHL de primera línea agresivo y NHL recidivante agresivo), NHL recidivante después de o refractario a trasplante de células madre autólogas, linfoma de linfocitos B grande mediastinal primario, linfoma de fusión primaria, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células no escindidas pequeñas de grado alto, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica granular grande (periférica) precursora, micosis fungoide y/o síndrome de Sezary, linfomas de piel (cutáneos), linfoma de células grandes anaplásico, linfoma angiocéntrico.

Una “enfermedad autoinmunitaria” en la presente memoria es una enfermedad o un trastorno que surge de o se dirige contra los propios tejidos u órganos de un individuo o una co-segregación o manifestación del mismo o afección resultante del mismo. En muchos de estos trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, pueden existir diversos marcadores clínicos y de laboratorio, incluyendo, pero sin limitación, hipergammaglobulinemia, altos niveles de autoanticuerpos, depósitos de complejo antígeno-anticuerpo en tejidos, beneficio de tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores, y agregados de células linfoides en tejidos afectados. Sin limitarse a ninguna teoría con respecto a la enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos B, se cree que los linfocitos B demuestran un efecto patógeno en enfermedades autoinmunitarias humanas mediante una multitud de vías mecánicas, incluyendo producción de autoanticuerpos, formación de complejos inmunitarios, activación de linfocitos T y células dendríticas, síntesis de citocinas, liberación directa de quimiocinas y provisión de un nido para neolinfogénesis ectópica. Cada una de estas rutas puede participar en diferentes grados en la patología de enfermedades autoinmunitarias.

Una “enfermedad autoinmunitaria” puede ser una enfermedad específica de órgano (es decir, la respuesta inmunitaria se dirige específicamente contra un sistema de órganos, tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinal y hepático, el sistema renal, el tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, polimiositis, etc.). Las preferidas de dichas enfermedades incluyen trastornos reumatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como LES y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangiitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis negativa para ANCA y vasculitis asociada con ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangiitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de mioclono opsoclono, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y síndrome de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, habones, pénfigo vulgar, pénfigoide ampolloso, y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusión y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades de la audición autoinmunitaria (tales como, por ejemplo, otitis interna y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con diabetes, tales como, diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Las más preferidas de dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada con ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves,

IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

Los ejemplos específicos de otras enfermedades autoinmunitarias como se definen en la presente memoria, que en algunos casos abarcan las enumeradas anteriormente, incluyen, pero sin limitación, artritis (aguda y crónica, artritis reumatoide incluyendo artritis reumatoide de aparición juvenil y estadios tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno de tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis por reducción de estrógenos, y espondilitis anquilosante/espondilitis reumatoide), enfermedad linfoproliferativa autoinmunitaria, enfermedades cutáneas hiperproliferativas inflamatorias, psoriasis tal como psoriasis de placas, psoriasis gotosa, psoriasis pustular y psoriasis en uñas, atopia incluyendo enfermedades atópicas tales como fiebre del heno y síndrome de Job, dermatitis, incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis exfoliante, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrosis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como EM espino óptica, EM progresiva primaria (EMPP) y EM remitente reincidente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arterioesclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, inflamación gastrointestinal, colitis tal como colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colágena, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante y colitis transmural, y enfermedad inflamatoria intestinal), inflamación del intestino, piodermia gangrenosa, eritema nodoso, colangiitis esclerosante primaria, síndrome de insuficiencia respiratoria, incluyendo síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto o agudo (SDRA), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, enfermedad de injerto contra huésped, angioedema, tal como, angioedema hereditario, lesión de nervios craneales como en meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito del escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmunitaria, pérdida repentina de audición debido a una afección autoinmunitaria, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis, tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveítis, tal como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN mediada por inmunidad, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN proliferativa membranosa o de membrana (MPGN), incluyendo de Tipo I y Tipo II y GN rápidamente progresiva (RPGN), nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmunitaria, balanitis incluyendo balanitis circunscrita plasmocelular, balanopostitis, eritema anular centrifugo, eritema discrómico persistente, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nítido, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, piodermia gangrenosa, afecciones y respuestas alérgicas, alergias alimentarias, alergias farmacológicas, alergias a insectos, trastornos alérgicos poco comunes tales como mastocitosis, reacción alérgica, eczema incluyendo eczema alérgico o atópico, eczema asteatótico, eczema dishidrótico, y eczema palmoplantar vesicular, asma tal como asma bronquial y asma autoinmunitario, afecciones que implican infiltración de linfocitos B y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunitarias contra antígenos extraños tales como grupos sanguíneos A-B-O fetales durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia en la adhesión de leucocitos, lupus, incluyendo nefritis lúpica, cerebritis lúpica, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extrarrenal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus de alopecia, LES, tal como LES cutáneo o LES cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (NLE) y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de aparición juvenil (Tipo I), incluyendo IDDM pediátrica, diabetes mellitus de aparición en adultos (diabetes de Tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, colitis diabética, trastorno de arterias grandes diabéticas, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de vasos grandes tales como polimialgia reumática y artritis de células gigantes (de Takayasu), vasculitis de vaso medio tal como enfermedad de Kawasaki y poliartritis nodosa/periarteritis nodosa, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis de hipersensibilidad, vasculitis necrotizante tal como vasculitis necrotizante fibrinoide y vasculitis necrotizante sistémica, vasculitis negativas para ANCA y vasculitis asociada con ANCA tal como síndrome de Churg-Strauss (CSS), granulomatosis de Wegener, y poliangiitis microscópica), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmunitaria, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), enfermedad de Addison, anemia o aplasia de glóbulos rojos pura (PRCA), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia o neutropenias autoinmunitarias, citopenias tales como pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesión orgánica múltiple tal como la secundaria de septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpo antifosfolípidos, mononeuritis, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de

Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide o pénfigo tal como penfigoide ampolloso, penfigoide cicatricial (membrana mucosa) penfigoide cutáneo, pénfigo vulgar, pénfigo paraneoplásico, pénfigo foliáceo, penfigoide de las membranas mucosas y pénfigo eritematoso, epidermolisis ampollosa adquirida, inflamación ocular, preferentemente inflamación ocular alérgica tal como conjuntivitis alérgica, enfermedad
5 ampollosa de IgA lineal, inflamación de la conjuntiva inducida por autoinmunidad, poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica debido a una afección autoinmunitaria, preeclampsia, una trastorno complejo inmunitario tal como nefritis de complejo inmunitario, nefritis mediada por anticuerpos, trastornos neuroinflamatorios, polineuropatías, neuropatía crónica tal como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como se desarrolla por pacientes con infarto de miocardio, por
10 ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura postransfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina y trombocitopenia autoinmunitaria o mediada por inmunidad incluyendo, por ejemplo, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluyendo ITP crónica o aguda, escleritis tal como querato escleritis idiopática, epiescleritis, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunitaria, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis tal como
15 tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica, (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, enfermedad ocular de Grave (oftalmopatía u oftalmopatía asociada a tiroides), síndromes poliglandulares tales como síndrome poliglandulares autoinmunitarios, por ejemplo, de tipo I (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome
20 de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o la persona rígida, encefalomiелitis tal como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia Grave tal como miastenia Grave asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonia, opsoclon o síndrome de opsoclon mioclon (OMS), y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica
25 autoinmunitaria, neumonitis, tal como neumonitis intersticial linfocítica (LIP), bronquiolitis obliterante (no de trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Berger (nefropatía de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis de IgA lineal, dermatosis neutrófila febril aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y neumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, enfermedad Celiaca, esprúe celiaco (enteropatía del gluten), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia tal como crioglobulinemia mixta, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las
30 arterias coronarias, enfermedad ótica autoinmunitaria tal como otitis interna autoinmunitaria (AIED), pérdida de audición autoinmunitaria, policondritis tal como policondritis refractaria, con recaída o reincidente, proteinosis alveolar pulmonar, queratitis tal como síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sífilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosace autoinmunitaria, dolor asociado con zoster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonal (por ejemplo, gamopatía monoclonal benigna y gamopatía monoclonal de importancia indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomerulosclerosis focal o segmental o focal segmental (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hematológico
40 autoinmunitario, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedad desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, por ejemplo, debida a anticuerpos anti espermatozoides, enfermedad del
45 tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome postcardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón del criador de pájaros, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad de pulmón intersticial, reacción a transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias tales como leishmaniasis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de
50 Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, mediastinitis fibrosante, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevado y persistente, eritoblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica), o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SCID (inmunodeficiencia combinada severa), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por ecovirus, septicemia (síndrome
55 de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes postvacunación, infección por rubéola congénita, infección por virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis postestreptocócica, tromboangiitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis de hipersensibilidad crónica, conjuntivitis, tal como catarro vernal, queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis epidérmica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión de reperusión por isquemia y familiar benigna, reperusión de órgano trasplantado, autoinmunidad retinal, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad pulmonar/de las vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos (insuficiencia vascular cerebral) tales como encefalopatía
60 arteriosclerótica y retinopatía arteriosclerótica, aspermigénesis, hemólisis autoinmunitaria, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso de lepra,

parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida de audición sensorial, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileitis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática (oftalmítis simpática), oftalmítis neonatal, neuritis óptica, uveítis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenosa, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, tinitis linfociliar, vitiligo, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T, deficiencia en adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, síndrome de lesión de múltiples órganos, enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixto, síndrome nefrótico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, síndromes poliglandulares autoinmunitarios, incluyendo síndrome poliglandular de tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de aparición en adultos (AOIH), cardiomiopatía, tal como cardiomiopatía dilatada, epidermólisis ampollosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, etmoide, sinusitis frontal, maxilar o esferoide, sinusitis alérgica, un trastorno relacionado con eosinófilos tal como eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löffler, neumonía eosinófila crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartropatías, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, colangitis esclerosante, escleritis, epiescleritis, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectasis, trastornos autoinmunitarios asociados con la enfermedad del colágeno, reumatismo tal como artrorreumatismo crónico, linfadenitis, reducción de la respuesta de presión sanguínea, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y vascularización asociada a enfermedades, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión de reperfusión, trastorno de reperfusión isquémica, lesión de reperfusión del miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia orgánica múltiple, enfermedades ampollosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados con transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación intratable crónica, pielitis, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis. Se contempla en la presente memoria que dichas enfermedades se tratan por la administración de un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de linfocitos B, tal como CD22, e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico como se desvela en la presente memoria. También se contempla en la presente memoria que dichas enfermedades se tratarán por terapia de combinación incluyendo un anticuerpo anti CD22 o conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 de la invención en combinación con otro anticuerpo o conjugado de fármaco y anticuerpo, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie.

Como se usa en la presente memoria, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar" o "tratando") se refieren a la intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo o célula que se trata, y puede realizarse para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen evitar la aparición o reaparición de la enfermedad, aliviar los síntomas, reducir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar metástasis, reducir la tasa de progresión de enfermedad, aliviar o paliar la patología, y remitir o mejorar el pronóstico. En algunas realizaciones, se usan anticuerpos de la invención para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno.

Un "individuo" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales deportivos, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto la dosis profiláctica se usa en los sujetos antes de o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, B²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina,

etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina y otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, toxinas, agentes inhibidores del crecimiento, restos farmacológicos y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Se describen posteriormente otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida provoca destrucción de células tumorales.

Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido botulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como anticabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfofamina; desmecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona, etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremophor, formulación de nanopartículas de paclitaxel obtenidas industrialmente con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y están con frecuencia en forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo completo. Pueden ser hormonas en sí mismos. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que actúan inhibiendo o anulando la función de los ovarios, por ejemplo, agonistas de la

hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) tal como acetato de leuprolida LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol

5 MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etridonato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como

10 troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (una molécula pequeña tirosina quinasa inhibidora doble de ErbB-2 y EGER también conocido como

15 GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa CD22) *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células

20 (tales como una célula que expresa CD22) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores en fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen en G1 también pueden detener en fase S, por

25 ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metrotexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo Europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la

30 despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

La expresión “metabolito intracelular” se refiere a un compuesto que resulta de un proceso metabólico o reacción dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso metabólico o reacción puede ser un

35 proceso enzimático, tal como escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazona, éster o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y fármacos libres que se han sometido a escisión intracelular después de entrada, difusión, captación o transporte en una célula.

Las expresiones “escindido intracelularmente” y “escisión intracelular” se refieren a un proceso metabólico o

40 reacción dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) por el que la unión covalente, es decir el enlazador, entre el resto farmacológico (D) y el anticuerpo (Ab) se rompe, dando como resultado el fármaco libre disociado del anticuerpo dentro de la célula. Los restos escindidos del ADC son de este modo metabolitos intracelulares.

45

El término “biodisponibilidad” se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la

50 medición tanto del tiempo (velocidad) como la cantidad total (alcance) del fármaco que alcanza la circulación general desde una forma de dosificación administrada.

La expresión “actividad citotóxica” se refiere a un efecto de destrucción de células, citostático o inhibidor del

55 crecimiento de un conjugado de anticuerpo-fármaco o un metabolito intracelular de un conjugado de anticuerpo-fármaco. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de CI_{50} , que es la concentración (molar o en masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

“Alquilo” es un hidrocarburo C1-C18 que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Son ejemplos el metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-

60 butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)CH₃), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)CH₂CH₂CH₃), 2-

65 metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 3,3-dimetil-2-butilo (-

CH(CH₃)C(CH₃)₃.

La expresión "alquilo C₁-C₈", como se usa en la presente memoria se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C₁-C₈" representativos incluyen, pero sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, los alquilos C₁-C₈ insaturados incluyen, pero sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, *n*-heptilo, isoheptilo, *n*-octilo e isooctilo. Un grupo alquilo C₁-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

"Alquenilo" es un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble carbono-carbono, sp². Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇) y 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH=CH₂).

"Alquinilo" es un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple carbono-carbono, sp. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH),

"Alquilenilo" se refiere a un radical hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes producidos por la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los radicales alquilenilo típicos incluyen, pero sin limitación: metileno (-CH₂-), 1,2-etilo (-CH₂CH₂-), 1,3-propilo (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), y similares.

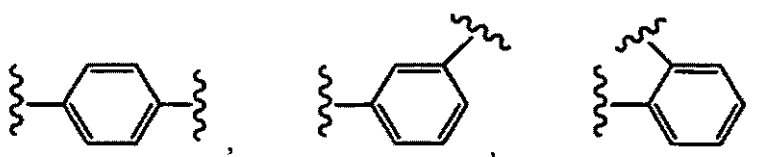
Un "alquilenilo C₁-C₁₀" es un grupo hidrocarburo de cadena lineal, saturado de la fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Los ejemplos de un alquilenilo C₁-C₁₀ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

"Alquenilenilo" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes producidos por la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de una alqueno parental. Los radicales alquenilenilo típicos incluyen, pero sin limitación: 1,2-etileno (-CH=CH-).

"Alquinilenilo" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal, ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes producidos por la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de un alquino parental. Los radicales alquinilenilo típicos incluyen, pero sin limitación: acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH₂C≡C-) y 4-pentinilo (-CH₂CH₂CH₂C≡C-).

"Arilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antraceno. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras:



en las que el grupo fenilo puede estar sustituido o no sustituido con hasta cuatro grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -

NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

"Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno enlazado con un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza con un radical arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. El grupo arilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo el resto alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alqueno o alquino, del grupo arilalquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo es de 5 a 15 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno enlazado con un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza con un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, 2-bencimidazolilmetilo, 2-furilmetilo y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo el resto alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alqueno o alquino, del grupo heteroarilalquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo es de 5 a 14 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros de anillo (de 2 a 6 átomos de carbono) o un biciclo que tenga de 7 a 10 miembros de anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

"Alquilo sustituido", "arilo sustituido" y "arilalquilo sustituido" significa alquilo, arilo y arilalquilo respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan cada uno independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S-, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR-, S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, en los que cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C₂-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄, un grupo protector o resto de profármaco. Los grupos alqueno, alqueno y alquino como se han descrito anteriormente también pueden sustituirse de forma similar.

"Heteroarilo" y "heterociclo" se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos de anillo son un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros de anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tenga de 7 a 10 miembros de anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta el presente), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

Los ejemplos de heterociclos incluyen como ejemplo y sin limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo, azufre oxidado, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoilo.

Como ejemplo y sin limitación, los heterocíclicos enlazados por carbono se enlazan en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofuranilo, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3 o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de una isoquinolina. Aún más normalmente, los heterociclos enlazados por carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, o 5-tiazolilo.

Como ejemplo y sin limitación, los heterociclos enlazados por nitrógeno se enlazan en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol,

pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1 H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina, y posición 9 de un carbazol, o β -carbolina. Aún más normalmente, los heterociclos enlazados por nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

5 Un "heterociclo C₃-C₈" se refiere a un carbociclo C₃-C₈ aromático o no aromático en el que de 1 a 4 de los átomos de carbono del anillo se reemplazan independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, 10 quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con hasta siete grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

15 "Heterociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterocíclico se reemplaza con un enlace. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con hasta seis grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

25 "Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de anillo, aún más normalmente de 5 a 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo dispuestos como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

30 Un "carbociclo C₃-C₈" es un anillo carbocíclico no aromático saturado o insaturado de 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8 miembros. Los carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, pero sin limitación, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C₃-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

40 Un "carbociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbocíclicos se reemplaza con un enlace.

45 "Enlazador" se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo con un resto farmacológico. En diversas realizaciones, los enlazadores incluyen un radical divalente tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades repetidas de alquiloxi (por ejemplo polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, Jeffamine™); y éster de diácido y amidas incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

50 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de imposibilidad de superposición de la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse en su imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

55 "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares la una de la otra. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

60 "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles la una de la otra.

65 Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas en la presente memoria generalmente siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada en

plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en plano por el compuesto, significando (-) o 1 que el compuesto es levógiro. Un compuesto prefijado con (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto porque son imágenes especulares el uno del otro. Un estereoisómero específico puede también denominarse enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina una mezcla racémica o un racemato, que puede aparecer cuando no hay estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

“Grupo saliente” se refiere a un grupo funcional que puede sustituirse por otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes se conocen bien en la técnica, y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), *p*-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

Componentes enlazadores:

MC = 6-maleimidocaproilo

Val-Cit o “vc” = valina-citrulina (un dipéptido ilustrativo en un enlazador escindible por proteasa)

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureido pentanoico

PAB = *p*-aminobenciloxicarbonilo (un ejemplo de un componente enlazador “autodestructivo”)

Me-Val-Cit = *N*-metil-valina-citrulina (en la que el enlace peptídico del enlazador se ha modificado para evitar su escisión por catepsina B)

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproil-polietilenglicol (puede unirse a cisteínas del anticuerpo).

SPP = *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato

SPDP = *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato

SMCC = succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato

IT = iminotiolano

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

MMAE = mono-metil auristatina E (MW 718)

MMAF = variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C del fármaco (PM 731,5)

MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en un enlace de amida con la fenilalanina C terminal (PM 801,5)

MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado con la fenilalanina

MMAF-NtBu = *N*-t-butilo, unido como una amida con el extremo C terminal de MMAF

DM1 = *N*(2')-desacetil-*N*(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina

DM3 = *N*(2')-desacetil-*N*2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina

DM4 = *N*(2')-desacetil-*N*2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina

Son abreviaturas adicionales las siguientes: AE es auristatina E, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproína, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido

dietilentriaminopentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina, EN-EM es espectrometría de masas por electronebulización, EtOAc es etil acetato, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonilo), gly es glicina, HATU es O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1S, 2R)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es bromo tris-pirrolidino fosfonio hexafluorofosfato, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

Composiciones y métodos para prepararlas

Se describen anticuerpos que se unen a CD22. Se proporcionan inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti CD22. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con la expresión alterada, por ejemplo, expresión aumentada, de CD22. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer.

Anticuerpos anti CD22

En un aspecto, la invención se refiere a anticuerpos que se unen a CD22. Se describen anticuerpos que se unen a una forma madura de CD22 humano y de mono cynomolgus (cyno). En un ejemplo, una forma madura de CD22 humano tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27. La isoforma humana principal madura tiene un dominio extracelular que comprende siete dominios de tipo Ig una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28. En otro ejemplo, una isoforma menor de CD22 humano que carece de los dominios extracelulares 3 y 4 tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29. La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la isoforma menor es SEC ID N°: 30. El CD22 de cyno tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31. En algunos ejemplos, un anticuerpo para CD22 se une a una forma madura de CD22 expresado en la superficie celular. En algunos ejemplos, un anticuerpo que se une a una forma madura de CD22 expresado en la superficie celular inhibe el crecimiento de la célula. En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 se une a una forma madura de CD22 expresado en la superficie celular e inhibe la proliferación celular. En ciertos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 se une a una forma madura de CD22 expresado en la superficie celular e induce muerte celular. En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 se une a una forma madura de CD22 expresado en la superficie de células cancerosas. En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 se une a una forma madura de CD22 que se sobreexpresa en la superficie de células cancerosas con respecto a las células normales del mismo origen tisular. En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 se conjuga con una citotoxina o un marcador detectable y se une a CD22 en una superficie celular. El conjugado de anticuerpo-toxina inhibe el crecimiento de la célula. En algunos ejemplos, el conjugado de anticuerpo-marcador detectable provoca que una célula que expresa CD22 en su superficie sea detectable *in vitro* o *in vivo*.

En un aspecto, un anticuerpo anti CD22 es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, un anticuerpo anti CD22 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En un aspecto, un anticuerpo anti CD22 es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos anti CD22 descritos en la presente memoria está purificado.

Se proporcionan en la presente memoria anticuerpos monoclonales ilustrativos derivados de una biblioteca de fagos. El antígeno usado para explorar la biblioteca fue un polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28 o SEC ID N°: 30, correspondiente a los dominios extracelulares (ECD) de CD22 beta y alfa. Los anticuerpos resultantes de la exploración de la biblioteca se maduran por afinidad.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con 10F4.4.1 murino, 10F4v1 y v3 humanizado y 5E8.1.8 murino por la unión con CD22. También se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que 10F4.4.1 murino, 10F4v1 y v3 humanizado y 5E8.1.8.

Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti CD22. Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti CD22. Se proporcionan células hospedadoras que comprenden dichos vectores. Se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos anti CD22 o polinucleótidos que codifican anticuerpos anti CD22. Una composición de la invención es una formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, tal como los enumerados en la presente memoria.

Administración y formulación de anticuerpos

El anticuerpo anti CD22 o conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 (incluyendo, pero sin limitación, un conjugado de fármaco tiomab con anti CD22 de la invención) puede administrarse en combinación con un antagonista de un antígeno de superficie de linfocitos B. La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden. En un

ejemplo, la administración es consecutiva o secuencial. En otro ejemplo, la administración es simultánea, concurrente o conjunta en la misma formulación. En un ejemplo, el antagonista del antígeno de superficie de linfocitos B es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el antagonista de superficie de linfocitos B es un conjugado de fármaco y anticuerpo.

Las formulaciones en la presente memoria pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpos anti CD22 u oligopéptido de unión a CD22, puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti CD22 que se une a un epítipo diferente en el polipéptido de CD22, o un segundo anticuerpo que se une a un antígeno de superficie de linfocitos B diferente o un anticuerpo para alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer particular. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

En la actualidad, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento de cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para retirar el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. La terapia de anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopeptídica puede ser especialmente deseable en pacientes ancianos que no toleren bien la toxicidad y efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica en la que la radioterapia tiene utilidad limitada. Los anticuerpos anti CD22 que se dirigen a tumores, conjugados farmacológicos de anticuerpo anti CD22 u oligopéptidos de la invención son útiles para aliviar cánceres que expresan CD22 tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido pueden usarse en solitario, o en terapia de combinación, por ejemplo, con hormonas, antiangiógenos, o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. Puede administrarse tratamiento con anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido junto con otras formas de terapia convencional, de forma consecutiva con, antes de o después de la terapia convencional. En el presente método para tratar o aliviar el cáncer, puede administrarse al paciente con cáncer anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido junto con el tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos precedentes. El anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. En otro ejemplo, el anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido se administra junto con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico. El Physicians' Desk Reference (PDR) desvela dosificaciones de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que se trate, el alcance de la enfermedad y otros factores con los que estará familiarizado el médico experto en la materia, y pueden determinarse por el médico.

En un ejemplo particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido conjugado con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado unido a la proteína CD22 se internaliza por la célula, dando como resultado un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa a la que se une. En un ejemplo, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Se han descrito anteriormente ejemplos de agentes citotóxicos e incluyen auristatinas, maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas, o derivados biológicamente activos de los mismos.

Los anticuerpos anti CD22, conjugados farmacológicos de anticuerpo anti CD22 u oligopéptidos o conjugados con toxina de los mismos se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 u oligopéptido.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 y oligopéptido. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente dicha terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o los anticuerpos anti CD22, conjugados farmacológicos de anticuerpo anti CD22 u oligopéptidos, con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral o antígeno de superficie de linfocitos B asociado con el cáncer particular.

En otro ejemplo, los métodos del tratamiento terapéutico implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti CD22, conjugado o conjugados farmacológicos de anticuerpo anti CD22 u oligopéptido u oligopéptidos y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina, así como combinaciones de agentes tales como, pero sin limitación, CHOP o FOLFOX. Pueden usarse programas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o como se determina de forma empírica por el experto en la materia. También se describen programas de preparación de dosificación para dicha quimioterapia en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992).

El anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. También se contempla la administración intratecal (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0009444, Grillo-Lopez, A, que se refiere al suministro intratecal de un anticuerpo de CD20). Preferentemente, la dosificación se proporciona por vía intravenosa o por vía subcutánea.

Puede administrarse un segundo medicamento con la exposición inicial y/o exposiciones posteriores del anticuerpo terapéutico o inmunoadhesina, dicha administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Aunque el anticuerpo anti CD22, conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22, inmunoadhesina u otro producto biológico terapéutico pueden administrarse como un único agente para tratar la enfermedad autoinmunitaria, generalmente, el anticuerpo terapéutico o inmunoadhesina se combinará con uno o más segundos medicamentos. Por ejemplo, para RA, y otras enfermedades autoinmunitarias, el anticuerpo, inmunoadhesina u otro fármaco biológico se combina preferentemente con uno cualquiera o más de los agentes inmunosupresores, agentes quimioterapéuticos, antagonistas de BAFF, antagonistas o anticuerpos de integrina y/o citocinas enumerados en la sección de definiciones anterior; uno cualquiera o más de fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARD), tales como hidroxycloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, azatioprina, D-penicilamina, Oro (oral), Oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina; inmunoadsorción de proteína A estafilocócica; inmunoglobulina intravenosa (IVIG); fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); glucocorticoides (por ejemplo mediante inyección en las articulaciones); corticosteroides (por ejemplo metilprednisolona y/o prednisona); folato; un antagonista anti factor de necrosis tumoral (TNF), por ejemplo, etanercept/ENBREL™, infliximab/REMICADE™, D2E7 (Knoll) o CDP-870 (Celltech); antagonista de IL-1R (por ejemplo Kineret); antagonista de IL-10 (por ejemplo, Ilodecakin); un modulador de la coagulación de la sangre (por ejemplo, WinRho); un antagonista de IL-6/anti-TNF (CBP 1011); antagonista de CD40 (por ejemplo, IDEC 131); antagonista del receptor de Ig-Fc (MDX33); inmunomodulador (por ejemplo, talidomida o ImmuDYN); anticuerpo anti-CD5 (por ejemplo, H5g1.1); inhibidor de macrófagos (por ejemplo, MDX 33); bloqueador coestimulador (por ejemplo, BMS 188667 o Tolerimab); inhibidor del complemento (por ejemplo, h5G1.1, 3E10 o un anticuerpo anti factor acelerador de la degradación (DAF)); antagonista de IL-2 (zxSMART); inhibidor de EGFR (véase la definición anterior); inhibidor de tirosina quinasa (véase la definición anterior); agente antiangiogénico (por ejemplo, anticuerpo de VEGF tal como bevacizumab); anticuerpos de CD22 tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®, Immunomedies), incluyendo epratuzumab Y-90 (Juwcid *et al.* Cancer Res 55 (23 Supl): 5899s-5907s (1995)), anticuerpo CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) y LymboScan Tc99 (Immunomedics); anticuerpo de EpCAM tal como 17-1A (PANOREX®); anticuerpo $\alpha\text{v}\beta 3$ (por ejemplo, VITAXIN®, Medimmune); anticuerpo de CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo de IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti linfocitos B (Impheron); MAb dirigido a linfocitos B (Immunogen/Aventis); ID09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo de Lym-1 Y-90 (USC); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo de BAFF (por ejemplo, documento WO 03/33658); anticuerpo del receptor de BAFF (por ejemplo, documento WO 02/24909); anticuerpo de BR3, anticuerpo de Blys tal como belimumab; LYMPHOSCD22 -B™; Oncolym anti Lym-1 (USC/Peregrine); ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idex 152; Biogen Idec); anticuerpo de receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo de IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo del receptor de quimiocinas, tal como un anticuerpo CCR2 (por ejemplo, MLN 1202; Millienneum); anticuerpo anti complemento, tal como anticuerpo C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo de IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818); vacuna de linfocitos B; DN-BAFF (Xencor); CRx-119 (CombinatoRx); antagonista de BAFF de Amgen; Pentostatina (Pfizer); IC-485 (ICOS); antagonista de quimiocinas tales como T-487 (Tularik) o Reticulosa (AVR-118); SCO-323 (SCIOS); antagonista de integrina 683699, Tanabe, NGD-2001-1 (Neurogen); SCIO-469 (SCIOS); BIRB-796 (Boehringer Ingelheim); VX702, VX850 (Vertex); antagonista de Leucotrieno B-4 (tal como amelubunt, BIIL-284; BI); modulador de microtúbulos (Paxceed; Angiotech); inhibidor de proteasa (MBS561392; BMS); AGIX-4207 (Atherogenics); ISIS-104838 (ISIS/Elan); MFG-IRAP (Univ. Pitt.); IL-1 Trap (RGN-303; Regeneron/Novartis); oprelvequina (Wyeth); everolimus (Certican; Novartis); Amevive (Biogen Idec); ORG-39141 (Organon); FK-506 (Fujisawa); y antagonista de IL-2 (tacrolimus; Fujisawa).

A continuación se proporciona en la presente memoria una descripción detallada de anticuerpos anti CD22 ilustrativos:

1. Anticuerpos anti CD22 específicos

En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; (c) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; y (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 14.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende al menos uno, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; (c) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6. En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; se describe en la presente memoria un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6;

un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6 y una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 2;

un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6 y una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 4;

un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 y una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4;

un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; y (c) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 14; un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 9; un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 10; un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 19-23; la HVR-L1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 en la que N28 se reemplaza por V (un cambio de aminoácido N28V, que genera SEC ID N°: 10); la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 en la que N28 se reemplaza por A (un cambio de aminoácidos N28A, que genera SEC ID N°: 19); la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 en la que N28 se reemplaza por Q (un cambio de aminoácidos N28Q, que genera SEC ID N°: 20); la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 en la que N28 se reemplaza por S (un cambio de aminoácidos N28S, que genera SEC ID N°: 21); la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 en la que N28 se reemplaza por D (un cambio de aminoácidos N28D, que genera SEC ID N°: 22); la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 en la que N28 se reemplaza por I (un cambio de aminoácidos N28I, que genera SEC ID N°: 23). Se describe también en la presente memoria un anticuerpo anti CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23, en la que la HVR-L1 es una cualquiera de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 y el aminoácido en la posición N30 (asparagina en la posición 30) se reemplaza por A (un cambio de aminoácidos N30A); o la HVR-L1 es una cualquiera de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 y el aminoácido en la posición N30 (asparagina en la posición 30) se reemplaza por Q (un cambio de aminoácido N30Q).

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende (a) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 and (b) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14. En algunos casos, el anticuerpo de CD22 comprende además (a) una HVR-H1 que comprende SEC ID N°: 2 y una HVR-H2 que comprende SEC ID N°: 4.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende (a) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 y (b) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12. En algunos casos, el anticuerpo de CD22 comprende además (a) una HVR-H1 que comprende SEC ID N°: 2 y una HVR-H2 que comprende SEC ID N°: 4.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende (a) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 y (b) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22 y 23. En algunos casos, el anticuerpo de CD22 comprende además (a) una HVR-H1 1 que comprende SEC ID N°: 2 y una HVR-H2 que comprende SEC ID N°: 4. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 comprende un cambio de aminoácidos N30A o N30Q. En algunos casos, el anticuerpo de CD22 comprende además HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12. En algunos casos, el anticuerpo de CD22 comprende además HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos es SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 seleccionada como HVR-L1 y se modifica por un cambio de aminoácidos N30A o N30Q.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti CD22 que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 16 (véase Figura 2A, h10F4v1). Un anticuerpo anti CD22 puede comprender un dominio variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 17 (véase Figura 2B, h10F4v1). En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti CD22 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 18 (véase Figura 2B, h10F4v3).

Un anticuerpo anti CD22 puede comprender una cadena pesada que comprende SEC ID N°: 34 (véase Figura 2A, m10F4). Un anticuerpo anti CD22 puede comprender una cadena ligera que comprende SEC ID N°: 35 (véase Figura 2B, m10F4).

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de HVR del anticuerpo 10F4.4.1 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y que tiene el número de referencia PTA-7621.

Un anticuerpo anti CD22 que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de HVR del anticuerpo 5E8.1.8 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y que tiene el número de referencia PTA-7620.

Un anticuerpo anti CD22 puede comprender cualquier secuencia de dominio variable marco conservada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad para unirse a CD22. Por ejemplo, en algunos casos, los anticuerpos anti CD22 de la invención comprenden una secuencia consenso marco conservada de cadena pesada de subgrupo III humana. En un ejemplo de estos anticuerpos, la secuencia consenso marco conservada de cadena pesada comprende una sustitución o sustituciones en la posición 71, 73 y/o 78. En un ejemplo de estos anticuerpos, la posición 71 es A, la posición 73 es T y/o la posición 78 es A. En un ejemplo, estos anticuerpos comprenden una secuencia marco conservada de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8, por ejemplo, SEC ID N°: 1, 3, 5, 7 (FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4, respectivamente). huMAb4D5-8 se conoce comercialmente como anticuerpo anti HER2 HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos; al que también se hace referencia en las Patentes de Estados Unidos N° 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93. En uno de dichos ejemplos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de marco de cadena ligera KI humana. En uno de dichos ejemplos, estos anticuerpos comprenden una secuencia marco de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8, por ejemplo SEC ID N°: 8, 1, 13, 15 (FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, respectivamente).

En un ejemplo, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia marco conservada y regiones hipervariables, en el que la secuencia marco conservada comprende las secuencias de FR-H1-FR-H4 de SEC ID N°: 1, 3, 5 y 7, respectivamente, la HVR H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; y la HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 6. En un ejemplo, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia marco conservada y regiones hipervariables, en el que la secuencia marco conservada comprende las secuencias de FR-L1-FR-L4 de SEC ID N°: 8, 11, 13 y 15, respectivamente; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 9, 10, 19, 20, 21, 22 y 23, en la que una cualquiera de SEC ID N°: 9-10 o 19-23 puede comprender un cambio de aminoácidos N30A o N30Q; la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; y la HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 14. En un ejemplo de estos anticuerpos, el dominio variable de cadena pesada comprende SEC ID N°: 16 y el dominio variable de cadena ligera comprende SEC ID N°: 17 o 18.

En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16. En algunos ejemplos, una secuencia

de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones, inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad para unirse a CD22. En algunos ejemplos, se ha sustituido, insertado o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia SEC ID N°: 16.

- 5 En algunos ejemplos, las sustituciones, inserciones o deleciones se realizan en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 16.

- 10 En algunos ejemplos, la invención proporciona un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada como se representa a continuación.

I Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro
Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (SEC ID N°: 16)

(los restos de HVR están subrayados).

- 15 En algunos ejemplos, las secuencias de HVR y FR de cadena pesada comprenden las siguientes:

- 20 HVR-H1 (SEC ID N°: 2)
 HVR-H2 (SEC ID N°: 4)
 HVR-H3 (SEC ID N°: 6)
 FR-H1 (SEC ID N°: 1)
 FR-H2 (SEC ID N°: 3) FR-H3 (SEC ID N°: 5)
 FR-H4 (SEC ID N°: 7)

- 25 En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena ligera como se representa a continuación.

I Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 108 (SEC ID N°: 17)

- 30 (los restos de HVR están subrayados y la posición N28 está en negrita) o

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 108 (SEC ID N°: 18)

(los restos de HVR están subrayados y la posición N28V está en negrita)

En algunas realizaciones, las secuencias de HVR de cadena ligera comprenden las siguientes:

- 5
- HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 9)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 10)
 HVR-L1 (Arg Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 19)
 HVR-L1 (Arg Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 20)
 10 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 21)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 22)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 23)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 32)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu, SEC ID N°: 33)
 15 HVR-L2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, SEC ID N°: 12)
 HVR-L3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, SEC ID N°: 14).

En algunas realizaciones, las secuencias de FR de cadena ligera comprenden las siguientes:

- 20 FR-L1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys, SEC ID N°: 8);
 FR-L2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, SEC ID N°: 11);
 FR-L3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEC ID N°: 13)
 25 FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys, SEC ID N°: 15).

- Se describe en la presente memoria un anticuerpo anti CD22 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 17 o 18. En algunos ejemplos, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones, adiciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad para unirse a CD22. En algunos ejemplos, se ha sustituido, insertado o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 17 o 18. En algunos ejemplos, las sustituciones, inserciones o deleciones se realizan en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 17 o 18.
- 30
- 35

- Se describe en la presente memoria un anticuerpo anti CD22 que comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 16; y (b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 17 o 18. En algunos ejemplos, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones, adiciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad para unirse a CD22. En algunos ejemplos, se ha sustituido, insertado o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de referencia. En algunos ejemplos, las sustituciones, inserciones o deleciones se realizan en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos ejemplos, un anticuerpo anti CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 18.
- 40
- 45
- 50

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti CD22 que comprende (a) una, dos o tres HVR VH seleccionadas de las mostradas en la Figura 2A y/o (b) una, dos o tres HVR VL seleccionadas de las mostradas en la Figura 2B; y un anticuerpo anti CD22 que comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado de los mostrados en la Figura 2A y un dominio variable de cadena ligera seleccionado de los mostrados en la Figura 2B.

Como se describe en la presente memoria, un anticuerpo anti CD22 puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones hipervariables del anticuerpo 5E8.1.8 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y que tiene el número de referencia PTA-7620.

2. Fragmentos de anticuerpo

La presente invención también se refiere a fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse por medios tradicionales, tales como, digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias hay ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) Nat. Med. 9: 129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden aislarse fragmentos de anticuerpo de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos epitópicos de unión a receptor de recuperación en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultan obvias para el experto en la materia. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para reducir la unión no específica durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión scFv para conseguir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

3. Anticuerpos humanizados

La invención se refiere a anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en el de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que normalmente se extraen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de regiones hipervariables con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpo quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana, que es más cercana a la del roedor, se acepta después como la secuencia marco conservada humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196: 901. Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151: 2623).

Es en general además deseable que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados por un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos

humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles habitualmente y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse de la secuencia receptora importada de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia sobre la unión de antígeno.

4. Anticuerpos humanos

Pueden construirse anticuerpos anti CD22 humanos combinando una secuencia o secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos derivadas de seres humanos con secuencia o secuencias de dominio constante humanas conocidas como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti CD22 monoclonales humanos por el método de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sea capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse la combinación de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedores, en la que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación de fagos como se describen en la presente memoria se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la retirada de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación de fago primario, es decir el epitopo domina (marca la impronta) de la elección del compañero de cadena humano. Cuando se repite el procedimiento para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos. Que no tienen restos de FR o CDR de origen no humano.

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En ciertos ejemplos, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertos ejemplos, una de las especificidades de unión es por CD22 y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertos ejemplos, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epitopos diferentes de CD22. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CD22. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a CD22 y una rama que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti interferón α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o isótopo radioactivo hapteno. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido al ordenamiento aleatorio de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en distintos vectores de expresión, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son de importancia particular.

En un ejemplo de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recupera de cultivo celular recombinante. La interfaz comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de entrecruzamiento adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol arsenita sódica para estabilizar ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica completamente humanizada F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios VH y VL de un fragmento a
 5 emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos
 10 Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

6. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por
 15 una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos multivalentes (que son de una clase distinta de IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertos ejemplos, el dominio de dimerización comprende (o
 20 consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales de la región Fc. En ciertos ejemplos, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a ocho sitios de unión a antígeno. En dicho ejemplo, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas
 25 comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)*n* -VD2-(X2)*n* -Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y *n* es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: cadena de VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena de VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria puede
 30 comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

7. Anticuerpos de un solo dominio

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo de un solo dominio. Un anticuerpo de un solo dominio es una cadena polipeptídica sencilla que comprende todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del
 40 dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos ejemplos, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano. (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 6.248.516 B1). En un ejemplo, un anticuerpo de un solo dominio consiste en todo o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

8. Variantes de anticuerpo

En algunos ejemplos, se contempla una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras
 50 propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos de anticuerpo del sujeto en el
 55 momento en el que se realiza esa secuencia.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells
 60 (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por un aminoácido cargado negativamente o neutro (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales o distintas en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que esté predeterminada la naturaleza
 65 de la mutación en sí misma. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis de exploración de alanina o aleatoria en el codón o región diana y se exploran las

inmunoglobulinas expresadas con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

En algunos casos, un anticuerpo se altera para aumentar o reducir el grado en que se glicosila un anticuerpo. La glucosilación de polipéptidos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares *N*-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o delección de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición, delección o sustitución de uno o más restos de serina o treonina con la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 (Presta, L.) se describen anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo. Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a anticuerpos con una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y Patente de Estados Unidos N° 6.602.684, Umana *et al.* Se presentan anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) que se refieren a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc del mismo. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) que trata de moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

En algunos ejemplos, una variante de glucosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen función de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la función de ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos “desfucosilados” o “deficientes en fucosa” incluyen: documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares con anulación, tales como células CHO con anulación del gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, (Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

En un caso, el anticuerpo está alterado para mejorar su semivida en suero. Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epitopo de unión al receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en el documento US 5739277, por ejemplo. Como se usa en la presente memoria, la expresión “epitopo de unión al receptor de recuperación” se refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (documentos US 2003/0190311, US6821505; US 6165745; US 5624821; US 5648260; US 6165745; US 5834 597).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazada por un resto diferente. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones preferidas”. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio deseable en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ilustrativas” en la Tabla 1, o como se describe

adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

TABLA 1

Resto Original	Sustituciones Ilustrativas	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

- 5 Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, in
10 Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

- 20 Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en sus propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

- 5 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o en los sitios restantes (no conservados).

- 10 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación con el anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una forma conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración de afinidad usando presentación de fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fago filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de cubierta de fago (por ejemplo, el producto del gen III de M 13) empaquetada dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración (por ejemplo, exploración de alanina) para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión con antígenos. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos cercanos son candidatos para sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en este campo, incluyendo las desarrolladas en la presente memoria. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variante se somete a exploración usando técnicas conocidas en este campo, incluyendo las descritas en la presente memoria, y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

- 30 Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

- 35 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo la de una cisteína bisagra.

- 40 De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunos casos, un anticuerpo puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos conservarían no obstante sustancialmente las mismas características requeridas para utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden realizarse ciertas alteraciones en la región Fc que daría como resultado alteración (es decir, mejora o reducción) de la unión de C1q y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y documento WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida con FcR. Véase, también, Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada con el receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG materna al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y aumento o reducción de la capacidad de unión de C1q en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

- 60 En la presente memoria se describen anticuerpos que comprenden modificaciones en la superficie de contacto de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, pudiendo situarse la protuberancia en la cavidad de modo que promueva la formación de complejos del primer y segundo polipéptidos de Fc. Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168.

65

9. Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico; poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), polivinil alcohol y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si más de un polímero está unido, este puede ser de la misma o de diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otro ejemplo, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En un ejemplo, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura a la que se destruyen las células próximas al resto no proteico de anticuerpo.

Algunos métodos para preparar anticuerpos

1. Algunos métodos basados en hibridoma

Los anticuerpos monoclonales anti CD22 pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con la proteína usada para inmunización. Se inducen anticuerpos para CD22 generalmente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de CD22 y un adyuvante. Puede prepararse CD22 usando métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en la presente memoria. Por ejemplo, puede producirse CD22 de forma recombinante. En una realización, los animales se inmunizan con un derivado de CD22 que contiene una parte extracelular de CD22 fusionada con la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, los animales se inmunizan con una proteína de fusión CD22-IgG1. En una realización, los animales se inmunizan con derivados inmunogénicos de CD22 en una solución con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas después los animales reciben una dosis de refuerzo. De siete a catorce días después se extraen muestras de sangre de los animales y se ensaya el suero con respecto al título del anti CD22. Los animales se reciben una dosis de refuerzo hasta conseguir que el título se nivele.

Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran en placas y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si la célula de mieloma parental carece de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

En algunas realizaciones, las células de mieloma son las que se fusionan eficazmente, soportan la producción a alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las células de mieloma ilustrativas incluyen, pero sin limitación, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California Estados Unidos, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se ensaya con respecto a producción de anticuerpos monoclonales que se unen a CD22. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

2. Algunos métodos de exploración de bibliotecas

Usando bibliotecas combinatorias pueden prepararse anticuerpos anti CD22 para explorar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conoce una diversidad de métodos para generar bibliotecas de presentación de fagos y explorar dichas bibliotecas con respecto a anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se describen en general en Hoogenboom *et al.* (2001) en Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ) y en ciertas realizaciones, en Lee *et al.* (2004) J. Mol. Biol. 340: 1073-1093.

En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan explorando bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionados con proteína de cubierta de fago. Dichas bibliotecas de fagos se seleccionan por cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse con el antígeno deseado se adsorben al antígeno y de este modo se separan de los clones no de unión en la biblioteca. Los clones de unión se eluyen después del antígeno, y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Puede obtenerse cualquiera de los anticuerpos anti CD22 de la invención diseñando un procedimiento de exploración de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti CD22 de longitud completa usando las secuencias Fv del clon de fago de interés y secuencias de región constante adecuadas (Fc) descritas en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Pueden presentarse dominios variables funcionalmente en fagos, bien como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), en los que la VH y VL están unidas por enlace covalente mediante un péptido corto, flexible, o bien como fragmentos Fab, en los que cada uno están fusionados con un dominio constante e interaccionan de forma no covalente, como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se usa en la presente memoria, los clones de fagos que codifican scFv y clones de fagos que codifican Fab se denominan conjuntamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

Pueden clonarse por separado repertorios de genes VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden explorarse con respecto a clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin tratamiento previo puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos contra una amplia serie de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse bibliotecas sin tratamiento previo sintéticamente clonando los segmentos de gen V no reordenados de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

En ciertas realizaciones, se usa fago filamentoso para presentar fragmentos de anticuerpo mediante fusión con la proteína de cubierta menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv de cadena sencilla, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona con pIII y la otra se segrega al periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde el ensamblaje de una estructura de proteína de cubierta-Fab comienza a presentarse en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de cubierta de tipo silvestre, como se describe, por

ejemplo, en Hoogenboom *et al.*, Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, se obtienen ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca con preferencia en favor de clones anti CD22, el sujeto se inmuniza con CD22 para generar una respuesta a anticuerpo y se recuperan células del bazo y/o linfocitos B en circulación, otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para construcción de bibliotecas. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpos humanos con preferencia en favor de clones anti CD22 generando una respuesta de anticuerpo anti CD22 en ratones transgénicos que portan una matriz de genes de inmunoglobulina humana funcionales (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales) de modo que la inmunización con CD22 de lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos contra CD22. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe posteriormente.

Puede obtenerse enriquecimiento adicional con respecto a poblaciones de células reactivas anti CD22 usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de CD22, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía de afinidad de CD22 o adsorción de células con CD22 marcado con fluorocromo seguido de separación de células activada por fluorescencia (FACS).

Como alternativa, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otras PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor presentación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que CD22 no sea antigénico. Para bibliotecas que incorporen una construcción génica de anticuerpos *in vitro*, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpo no reordenados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse de una diversidad de especies animales, tales como especies humana, de ratón, de rata, de lagomorfos, lupinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas y aviares, etc.

Se recuperan ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos variables de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reordenadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), realizando de este modo diversos repertorios de genes V para expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad de la biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia génica V para amplificar todos los ordenamientos VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción poco comunes dentro del cebador de PCR como un marcador en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o por amplificación por PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente pueden derivar *in vitro* de segmentos génicos V. La mayoría de los segmentos génicos de VH humanos se han clonado y secuenciado (presentado en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y mapeado (presentado en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) puede usarse para generar diversos repertorios génicos de VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden prepararse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia centrada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos V κ y V λ humanos (presentado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basándose en una serie de pliegues VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de ADN que codifican genes V, los segmentos de gen V de línea germinal pueden reordenarse *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios de genes VH y VL juntos de varias maneras. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por

ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recomendación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar la limitación del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Se clonan por separado repertorios VH y VL sin tratamiento previo, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos bibliotecas se combinan después por infección por fago de bacterias que contienen fagémidos de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca se limita solamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se empaquetan juntos en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de anticuerpos diversos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR y después clonarse, por ejemplo como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje de PCR también puede usarse para unir ADN VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena sencilla (scFv). En otra técnica más, se usa "ensamblaje por PCR en célula" para combinar genes VH y VL dentro del linfocitos por PCR y después clonar repertorios de genes unidos como se describe en Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratamiento previo (naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M $^{-1}$), pero la maduración de afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y volviendo a seleccionar a partir de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), mencionado anteriormente. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (presentada en Leung *et al.*, Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, puede realizarse maduración de afinidad mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan una secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y explorando con respecto a clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un método para inducir mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación de fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorar con respecto a mayor afinidad en varios ciclos de redistribución de cadena como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

Puede conseguirse exploración de las bibliotecas por diversas técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, puede usarse CD22 para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas en placas de adsorción o usarse en separación de células, o conjugarse con biotina para captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o usarse en cualquier otro método para selección en bibliotecas de presentación de fagos.

Las muestras de biblioteca de fagos se ponen en contacto con CD22 inmovilizado en condiciones adecuadas para unir al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen por ácido, por ejemplo como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo como se describe en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o por competición de antígeno de CD22, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en un único ciclo de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a ciclos adicionales de selección.

La eficacia de selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago pueden interaccionar simultáneamente con el antígeno. Pueden conservarse anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) mediante el uso de lavados cortos, presentación de fagos multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solamente estabiliza el fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece la nueva unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación de fago monovalente como se describe en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por CD22. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo como se realiza en algunas técnicas de maduración de afinidad) probablemente dé lugar a muchos mutantes, la mayoría que se unen al antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con CD22 limitante, puede ganarse por competencia a fagos de afinidad alta poco comunes. Para conservar todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con

exceso de CD22 biotinilado, pero con el CD22 biotinilado a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para CD22. Los fagos de unión de alta afinidad pueden después capturarse por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura de equilibrio" muestra que los anticuerpos se seleccionan de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con afinidad tan poco como dos veces mayor de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de los fagos unidos con una fase sólida también pueden manipularse para diferenciar basándose en la cinética de disociación.

Pueden seleccionarse clones anti CD22 basándose en la actividad. En ciertos casos, los anticuerpos anti CD22 se unen a células vivas que expresan de forma natural CD22, o bloquean la unión entre un ligando de CD22 y CD22, pero no bloquean la unión entre un ligando de CD22 y una segunda proteína. Los clones de Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti CD22 pueden seleccionarse (1) aislando clones anti CD22 de una biblioteca de fagos como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos cultivando la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) seleccionando CD22 y una segunda proteína contra la que se desea actividad de bloqueo y no de bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago anti CD22 con CD22 inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión con CD22 que solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluir los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, pueden enriquecerse adicionalmente clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas repitiendo los procedimientos de selección descritos en la presente memoria una o más veces.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones Fv de presentación de fagos se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de cadena pesada y ligera de interés de molde de ADN de hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN codificante de anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como ser humano) y después fusionado con el ADN de región constante de otra especie animal para formar secuencia o secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa, "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en la presente memoria. En ciertas realizaciones, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humana para formar secuencia o secuencias codificantes para cadenas pesadas y/o ligeras o humanas de longitud completa o parcial.

El ADN que codifica el anticuerpo anti CD22 derivado de un hibridoma también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo con la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo como en el método de Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de clon Fv o hibridoma puede modificarse adicionalmente mediante unión covalente con la secuencia codificante de inmunoglobulina, toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon Fv o anticuerpos derivados del clon de hibridoma.

3. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección de vector depende en parte de la célula hospedadora que se use. Generalmente, las células hospedadoras son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas:

Construcción de vector

5 Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas pueden aislarse y secuenciarse de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando técnicas de PCR o sintetizador de nucleótidos. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en
10 hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para este fin. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente
15 incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies
20 compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y de este modo proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos
25 microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.648.237.

30 Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, puede utilizarse un bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

35 El vector de expresión puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada corriente arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente quedan en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o
40 un cambio en la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la
45 secuencia promotora aislada en el vector. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para amplificación y/o expresión directa de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

50 Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o el trc. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo a un trabajador cualificado unirlos operativamente a cistrones que codifiquen las cadenas ligeras y
55 pesadas (Siebenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la
60 secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin debería ser una que se reconozca y procese (es decir se escinda por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de enterotoxina estable frente al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En un
65 caso, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o

variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas puede realizarse en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistron. A este respecto, las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas de hospedadores (por ejemplo, las cepas *trxB-* de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

También pueden producirse anticuerpos usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de anticuerpos secretados y ensamblados de forma apropiada. Dicha modulación de consigue al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de traducción para los componentes polipeptídicos.

Se desvela una técnica para modular la fuerza de traducción en Simmons *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.840.523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) dentro de un cistron. Para una TIR dada, puede crearse una serie de variantes de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico con una serie de fuerzas de traducción, proporcionando de este modo un medio conveniente por el que ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Pueden generarse variantes de TIR por técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios codónicos que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En ciertas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco codónico" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede conseguirse cambiando la tercera posición de nucleótido en cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la realización del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

En una realización, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistron en los mismos. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena así como el rendimiento de los productos del anticuerpo deseados en diversas combinaciones de fuerzas de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons *et al.* Patente de Estados Unidos Nº 5.840.523. Basándose en la comparación de fuerzas de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vectores de expresión.

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos incluyen Arqueobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilos* (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gram negativas. En una realización, se usan células *E. coli* como hospedadores. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Nº de Depósito de ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 Δ hfuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de Estados Unidos Nº 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse de forma adecuada especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como el hospedador cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para proporcionar el replicón. Normalmente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse idealmente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

Producción de anticuerpos

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o bien por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. Generalmente

se usa el tratamiento de calcio que emplea cloruro cálcico para células bacterianas que contengan barreras de pared celular sustanciosas. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es la electroporación.

- 5 Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo luria (LB) más complementos nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, seleccionado basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir de forma selectiva el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade
10 ampicilina a medios para el cultivo de células que expresan gen resistente a ampicilina.

También puede incluirse cualquier complemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo consistente en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneol y ditioneol.
15

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. En ciertas realizaciones, para el cultivo de *E. coli*, las temperaturas de cultivo varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C; de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier
20 pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. En ciertas realizaciones, para *E. coli*, el pH es de aproximadamente 6,8, aproximadamente 7,4 o aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, la expresión proteica se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante para fosfato para inducción. En ciertas realizaciones, el medio limitante para fosfato es medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263): 133-147). Puede usarse una diversidad de inductores adicionales, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.
25
30

En una realización, los polipéptidos expresados se secretan en y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se han roto las células, los residuos celulares o células completas pueden retirarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo filtrarse y concentrarse para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando métodos habitualmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.
35
40

En un aspecto, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades por un procedimiento de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación semicontinuos a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1.000 litros de capacidad, y en ciertas realizaciones, de aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a fermentación en un fermentador que es de no más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.
45

En un procedimiento de fermentación, la inducción de expresión proteica se inicia normalmente después de haberse cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una diversidad de inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque pueden usarse tiempos de inducción más largos o más cortos.
50
55

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procariotas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y solubilidad apropiados de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.
60
65

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse ciertas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly *et al.* (1998), mencionado anteriormente; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

En una realización, se usan cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospedadoras en el sistema de expresión de la invención.

Purificación de anticuerpos

En una realización, la proteína de anticuerpo producida en la presente memoria se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoforografía, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa Proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación de inmunoafinidad de los productos de anticuerpo. La Proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aurea* que se une con una alta afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la Proteína A puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio poroso controlada o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se recubre con un reactivo, tal como glicerol, para evitar posiblemente la adherencia no específica de contaminantes.

Como la primera etapa de purificación, como se ha descrito anteriormente puede aplicarse una preparación derivada del cultivo celular en una fase sólida con Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés con la Proteína A. La fase sólida se lavaría después para retirar contaminantes no unidos específicamente con la fase sólida. Finalmente se recupera el anticuerpo de interés de la fase sólida por elución.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas:

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota generalmente incluye uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada puede ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En la expresión celular de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamíferos así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo.

Origen de replicación

Generalmente, no es necesario un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano.

Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles de los medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y de este modo sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se identifican en primer lugar células transformadas con el gen de selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) por cultivo celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicósido; por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase, Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce el organismo hospedador y está unido operativamente con el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Por ejemplo, prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. En ciertas realizaciones, cualquiera o todas de estas secuencias pueden insertarse de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos N° 4.419.446. Se describe una modificación de ese sistema en la Patente de Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982), que describe la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del Virus del Sarcoma de Rous como el promotor.

Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) que describe elementos potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido de anticuerpo, pero generalmente se localizan en un sitio 5' del promotor.

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de

poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

Selección y transformación de células hospedadoras

5 Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente memoria incluyen células eucariotas superiores descritas en la presente memoria, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de cercopiteco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); 15 células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

20 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

25 Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo pueden cultivarse en una diversidad de medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), (Sigma) son adecuados para cultivar las células 30 hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30.985 como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento a 35 concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

Purificación de anticuerpos

45 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, pueden retirarse los residuos de partículas, bien células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión pueden en primer lugar concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, 50 una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, 55 cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica conveniente. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basen en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Methods 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad puede ser agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de 65 proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparin SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de

intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofor, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a purificación adicional, por ejemplo, por cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de sal aproximadamente 0-0,25 M).

En general, están bien establecidas en la técnica diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayos y uso clínico, coherentes con las metodologías anteriormente descritas y/o según se consideren apropiadas por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

Inmunoconjugados

La invención proporciona inmunoconjugados (denominados de forma intercambiable “conjugados de anticuerpo-fármaco” o “AD-C”) que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 conjugados con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD22 y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Se describen en la presente memoria (por ejemplo, anteriormente), agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados. También pueden usarse toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas y se describen en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD22 y una o más toxinas de moléculas pequeñas, incluyendo, pero sin limitación, fármacos de moléculas pequeñas tales como caliqueamicina, maitansinoide, dolastatina, auristatina, tricoteceno y CC 1065 y los derivados de estos fármacos que tienen actividad citotóxica. Se analizan ejemplos de dichos inmunoconjugados en más detalle posteriormente.

1. Inmunoconjugados ilustrativos - Conjugados de fármaco y anticuerpo

Un inmunoconjugado (o “conjugado de anticuerpo-fármaco” (“ADC”)) de la invención puede ser de Fórmula I, posterior, en la que un anticuerpo anti-CD22 está conjugado (es decir, unido covalentemente) con uno o más restos farmacológicos (D) mediante un enlazador opcional (L).



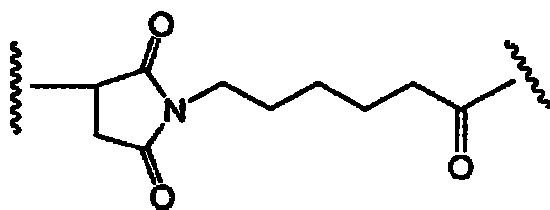
En consecuencia, el anticuerpo anti-CD22 puede estar conjugado con el fármaco directamente o mediante un enlazador. En la Fórmula I, p es el número medio de restos farmacológicos por anticuerpo, que puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, y en ciertas realizaciones, de 1 a aproximadamente 8 restos farmacológicos por anticuerpo.

Enlazadores ilustrativos

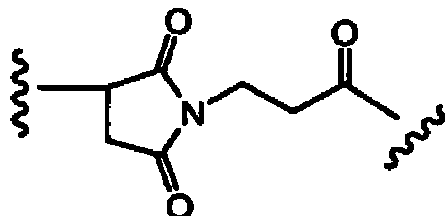
Se desvelan en la presente memoria enlazadores y restos farmacológicos ilustrativos. Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ilustrativos incluyen 6-maleimidocaproilo (“MC”), maleimidopropanoilo (“MP”), valina-citrulina (“val-cit” o “vc”), alanina-fenilalanina (“alaph”), p-aminobenciloxycarbonilo (un “PAB”), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (“SPP”), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (“SMCC”) y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (“SIAB”). Se conocen en la técnica diversos componentes enlazadores, algunos de los cuales se describen a continuación.

Un enlazador puede ser un “enlazador escindible”, que facilita la liberación de un fármaco en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido (por ejemplo, hidrazona), enlazador sensible a proteasa (por ejemplo, sensible a peptidasa), enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

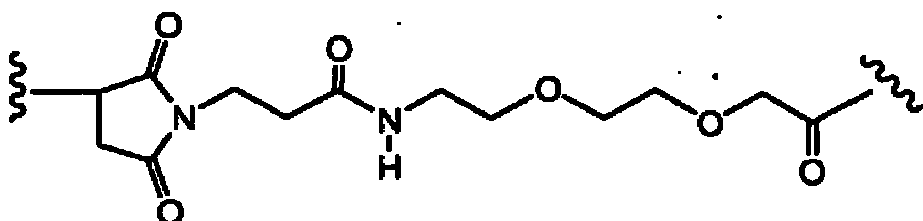
En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una “unidad extensora” que une un anticuerpo con otro componente enlazador o con un resto farmacológico. Se muestran a continuación unidades extensoras ilustrativas (en las que la línea ondulada indica sitios de unión covalente con un anticuerpo):



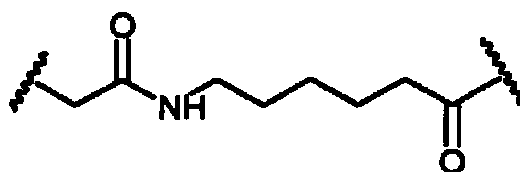
MC



MP



MPEG



5

10

15

20

En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una unidad de aminoácidos. En una realización tal, la unidad de aminoácidos permite la escisión del enlazador por una proteasa, facilitando de este modo la liberación de fármaco del inmunoconjugado tras su exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas. Véase, por ejemplo, Doronina *et al.* (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778-784. Las unidades de aminoácidos ilustrativas incluyen, pero sin limitación, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido y un pentapéptido. Los dipéptidos ilustrativos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); o *N*-metilo-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos ilustrativos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender restos de aminoácidos que son de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Las unidades de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D o una plasmina proteasa.

25

30

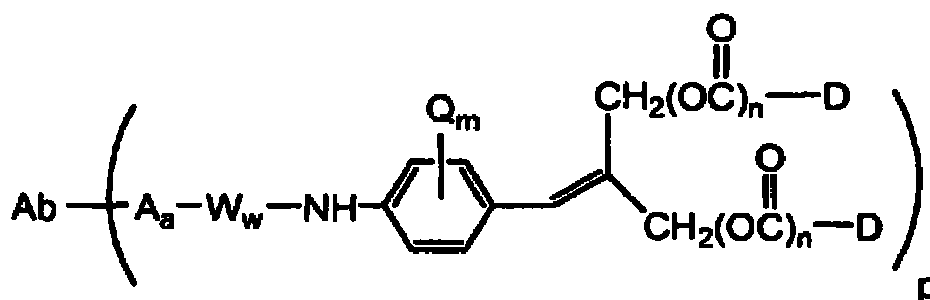
En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una unidad “espaciadora” que une el anticuerpo con un resto farmacológico, directamente o por medio de una unidad extensora y/o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser “autoinmoladora” o una “no autoinmoladora”. Una unidad espaciadora “no autoinmoladora” es una en la que parte de o toda la unidad espaciadora permanece unida al resto farmacológico tras la escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica) del ADC. Los ejemplos de unidades espaciadoras no autoinmoladoras incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. También se contemplan otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de escisión enzimática específica de secuencia. Por ejemplo, la escisión enzimática de un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina por una proteasa asociada a célula tumoral daría como resultado la liberación de un resto farmacológico-glicina-glicina del resto del ADC. En una realización tal, el resto farmacológico-glicina-glicina se somete después a una etapa de hidrólisis separada en la célula tumoral, escindiendo de este modo la unidad espaciadora de glicina-glicina del resto farmacológico.

35

Una unidad espaciadora “autoinmoladora” permite la liberación del resto farmacológico sin una etapa de hidrólisis separada. En ciertas realizaciones, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad de *p*-aminobencilo. En una de dichas realizaciones, se une un alcohol *p*-aminobencílico a una unidad de aminoácidos mediante un enlace amida, y se realiza un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y un agente citotóxico. Véase, por ejemplo, Hamann *et al.* (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087-1103. En

una realización, la unidad espaciadora es *p*-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En ciertas realizaciones, la parte de fenileno de una unidad de *p*-aminobencilo se sustituye con Q_m, en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4. Los ejemplos de unidades espaciadoras autoinmoladoras incluyen además, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al alcohol *p*-aminobencílico (véase, por ejemplo, documento US 2005/0256030 A1), tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay *et al.* (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237) y orto- o para-aminobenzilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis de su enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues *et al.*, Chemistry Biology, 1995, 2, 223); sistemas de anillo biciclo [2.2.1] y biciclo [2.2.2] sustituidos de forma apropiada (Storm, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815); y amidas de ácido 2-aminofenilpropionico (Amsberry, *et al.*, J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que se sustituyen en la posición α de glicina (Kingsbury, *et al.*, J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmoladores útiles en ADC.

En una realización, una unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificada como se representa a continuación, que puede usarse para incorporar y liberar múltiples fármacos.



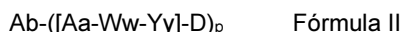
Escisión
enzimática



2 fármacos

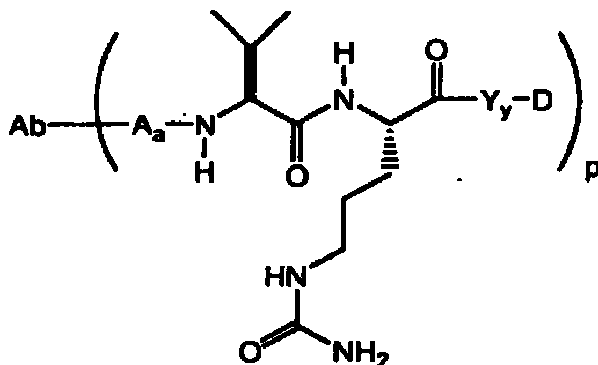
en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

Un enlazador puede comprender uno cualquiera o más de los anteriores componentes enlazadores. En ciertas realizaciones, un enlazador es como se muestra entre paréntesis en la siguiente Fórmula II de ADC.

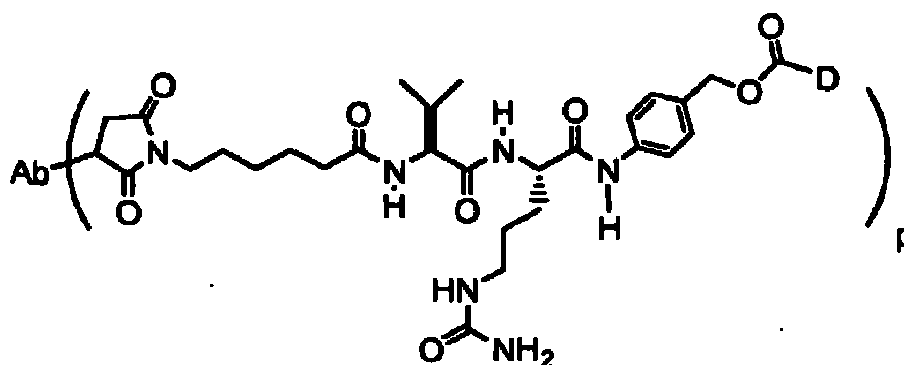
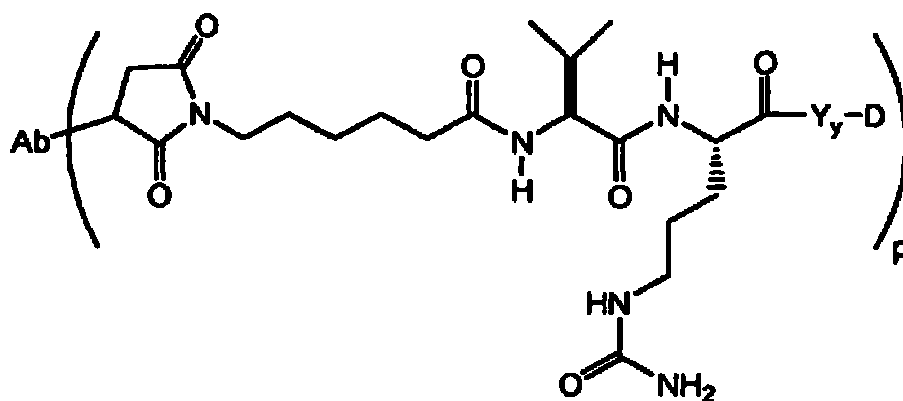


en la que A es una unidad extensora, y a es un número entero de 0 a 1; W es una unidad de aminoácidos, y w es un número entero de 0 a 12; Y es una unidad espaciadora y y es 0, 1 o 2; y Ab, D y p se definen como anteriormente para la Fórmula I. Se describen realizaciones ilustrativas de dichos enlazadores en el documento 20050238649 A1.

Se muestran a continuación componentes enlazadores ilustrativos y combinaciones de los mismos en el contexto de los ADC de Fórmula II:



Val-Cit o VC



- 5 Pueden sintetizarse componentes enlazadores, incluyendo unidades extensoras, espaciadoras y de aminoácidos, por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento US 2005-0238649 A1.

Restos farmacológicos ilustrativos

10 Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos N° 3896111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de Estados Unidos N° 4.151.042). Se desvelan maitansinol

15 N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

20 Los restos farmacológicos de maitansinoide son restos farmacológicos atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química o derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra

25 una diversidad de líneas celulares tumorales.

Se conocen bien en la técnica compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos farmacológicos de maitansinoide y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase, Yu *et al* (2002) PNAS 99: 7968-7973). También pueden prepararse de forma

30 sintética maitansinol y análogos de maitansinol de acuerdo con métodos conocidos.

Las realizaciones ilustrativas de restos farmacológicos de maitansinoide incluyen: DM1; DM3 y DM4, como se desvela en la presente memoria.

35 Auristatinas y dolastatinas

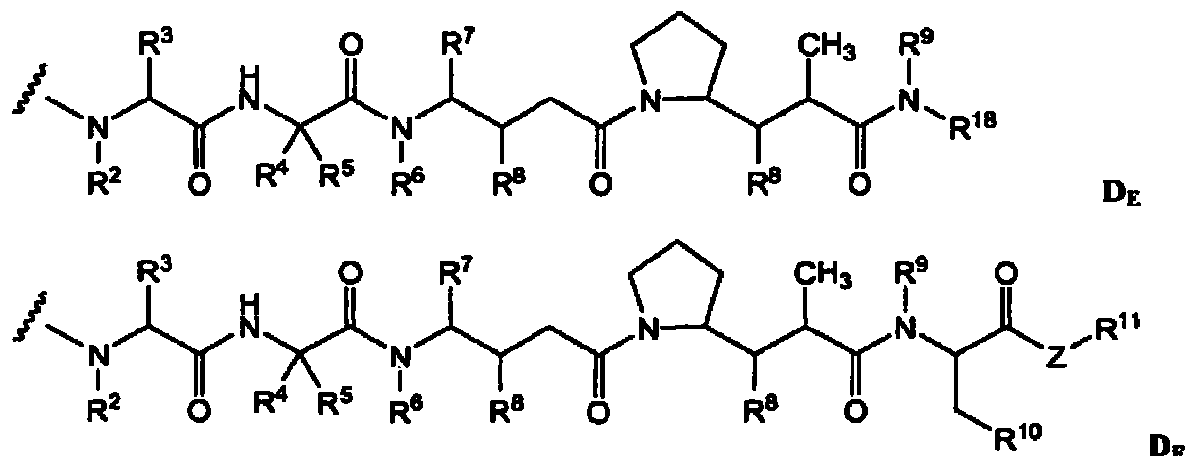
En algunas realizaciones, un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatina o un análogo peptídico o derivado de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patentes de Estados Unidos N° 5635483; 5780588). Se han mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámicas de

40 microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother.

45(12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (Patente de Estados Unidos N° 5663149) y antifúngica (Pettit *et al* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965). El resto farmacológico de dolastatina o auristatina puede unirse con el anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

5 Las realizaciones de auristatina ilustrativas incluyen los restos farmacológicos de monometilauristatina unidos por N terminal DE y DF, desvelados en Senter *et al*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Número de Resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

10 Un resto farmacológico peptídico puede seleccionarse de las Fórmulas DE y DF a continuación:



15 en las que la línea ondulada de DE y DF indica sitios de unión covalente con un anticuerpo o componente enlazador del anticuerpo, e independientemente en cada localización:

20 R² se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;
 R³ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);
 R⁴ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);
 R⁵ se selecciona de H y metilo;
 o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n- en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;
 R⁶ se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;
 R⁷ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);
 30 cada R⁸ se selecciona independientemente de H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y O-(alquilo C₁-C₈);
 R⁹ se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;
 R¹⁰ se selecciona de arilo o heterociclo C₃-C₈;
 Z es O, S, NH o NR¹², en la que R¹² es alquilo C₁-C₈;
 R¹¹ se selecciona de H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴ o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;
 35 m es un número entero que varía de 1 a 1000;
 R¹³ es alquilo C₂-C₈;
 R¹⁴ es H o alquilo C₁-C₈;
 cada aparición de R¹⁵ es independientemente H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, o -(CH₂)_n-SO₃- alquilo C₁-C₈;
 40 cada aparición de R¹⁶ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)_n-COOH;
 R¹⁸ se selecciona de -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(heterociclo C₃-C₈) y -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(carbociclo C₃-C₈);
 y
 n es un número entero que varía de 0 a 6.

45 En una realización, R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o *sec*-butilo y R⁵ es H o metilo. En una realización ilustrativa, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es -H, y R⁷ es *sec*-butilo.

En otra realización más, R² y R⁶ son cada uno metilo y R⁹ es -H.

50 En otra realización más, cada aparición de R⁸ es -OCH₃.

En una realización ilustrativa, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es $-H$, R^7 es *sec*-butilo, cada aparición de R^8 es $-OCH_3$ y R^9 es $-H$.

En una realización, Z es $-O$ o $-NH$.

En una realización, R^{10} es arilo.

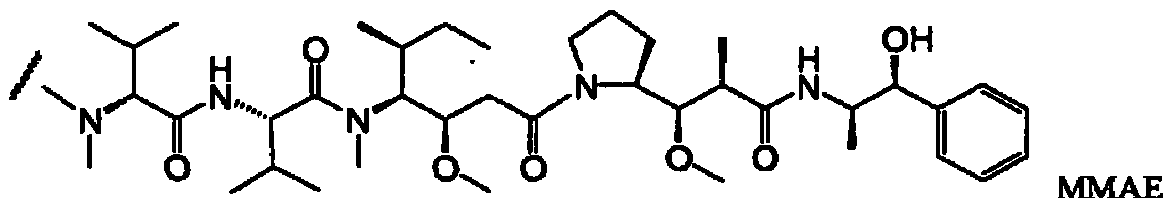
En una realización ilustrativa, R^{10} es $-fenilo$.

En una realización ilustrativa, cuando Z es $-O$, R^{11} es $-H$, metilo o *t*-butilo.

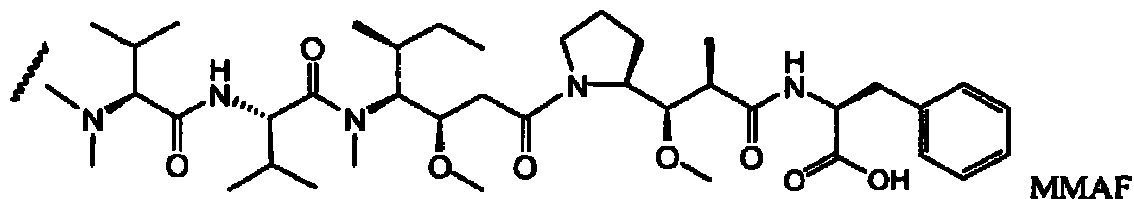
En una realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, en la que R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es $-alquilo\ C_1-C_8$ o $-(CH_2)_n-COOH$.

En otra realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$ en la que R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$.

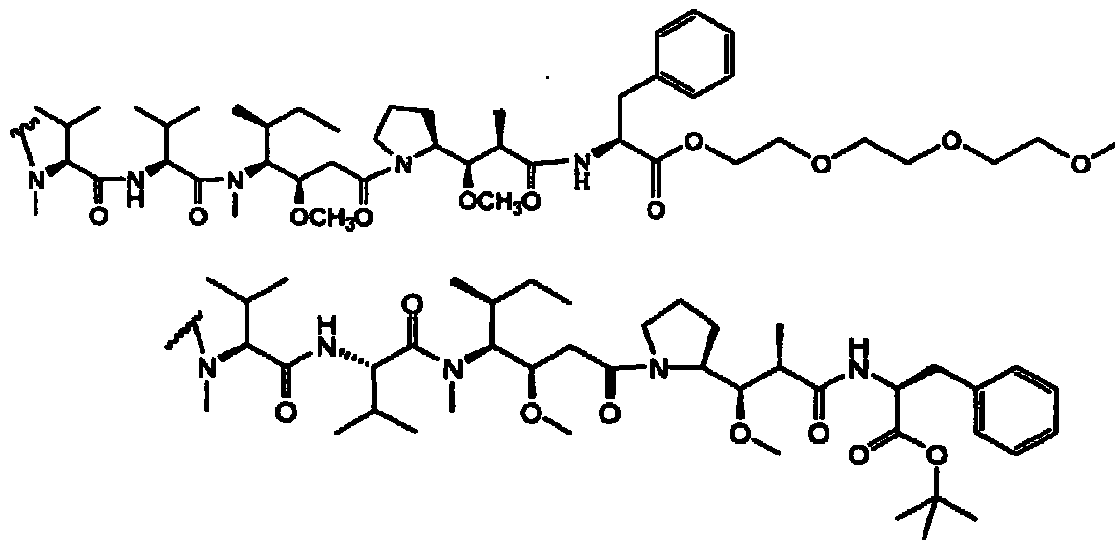
Una realización de auristatina ilustrativa de fórmula D_E es MMAE, en la que la línea ondulada indica la unión covalente con un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:

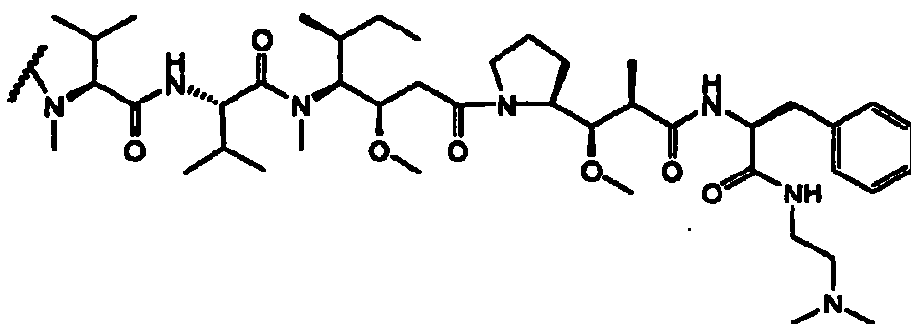
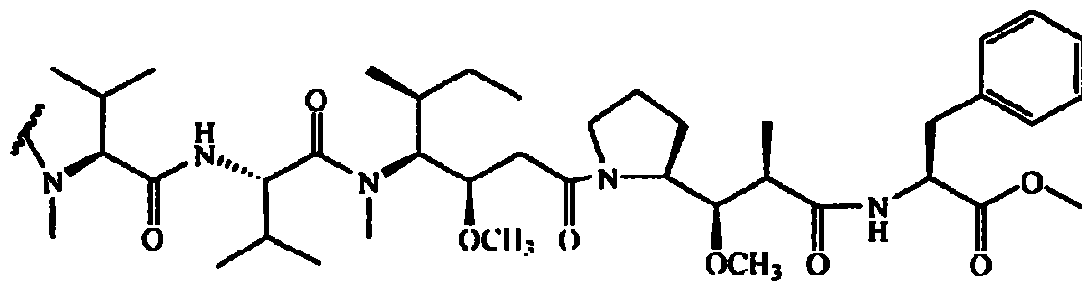
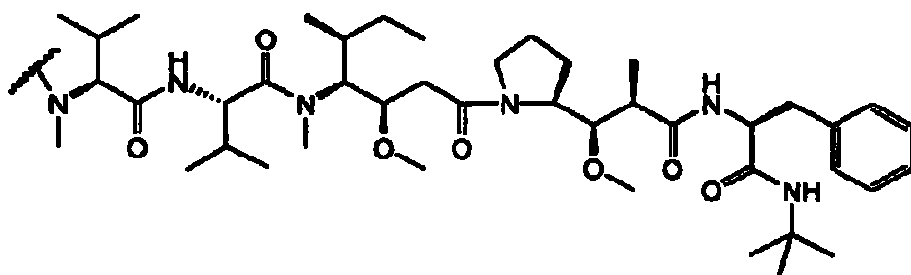


Una realización de auristatina ilustrativa de fórmula D_F es MMAF, en la que la línea ondulada indicada la unión covalente con un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco (véase el documento US 2005/0238649 y Doronina *et al.* (2006) *Bioconjugate Chem.* 17: 114-124):

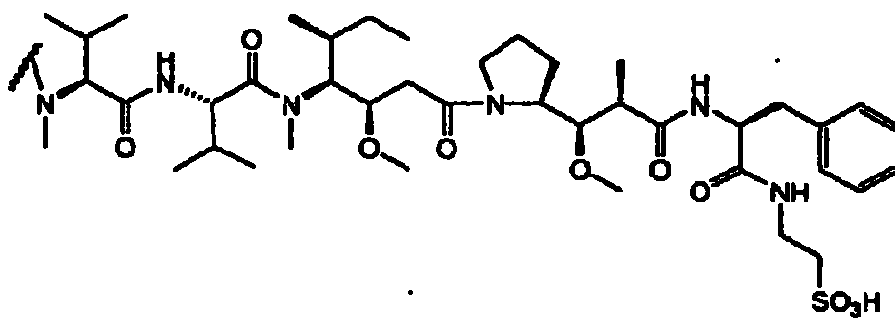
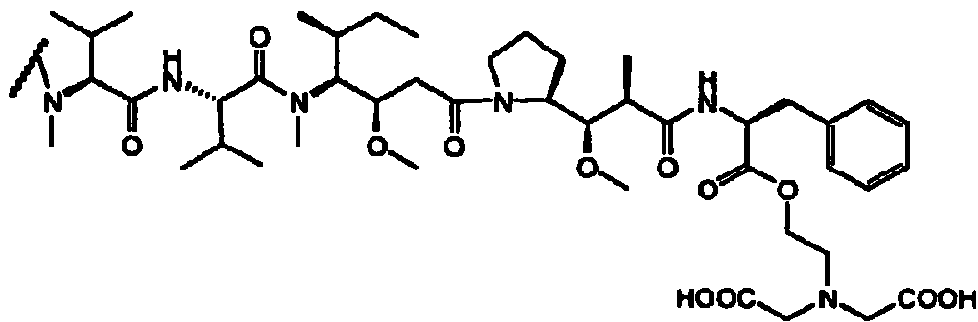


Otros restos farmacológicos incluyen los siguientes derivados de MMAF, en los que la línea ondulada indica la unión covalente con un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:

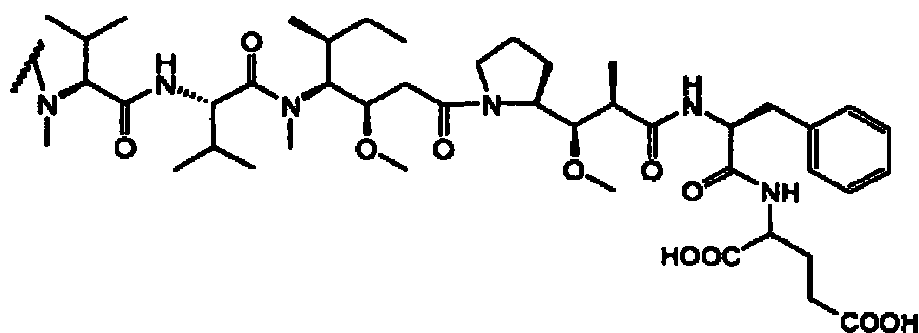




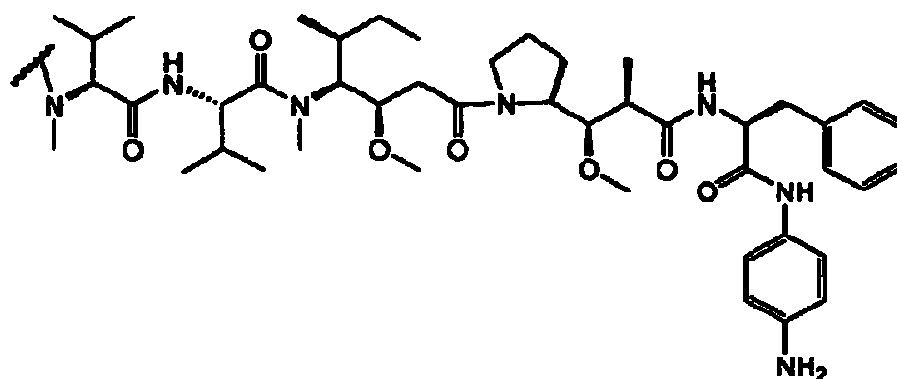
5



10



y

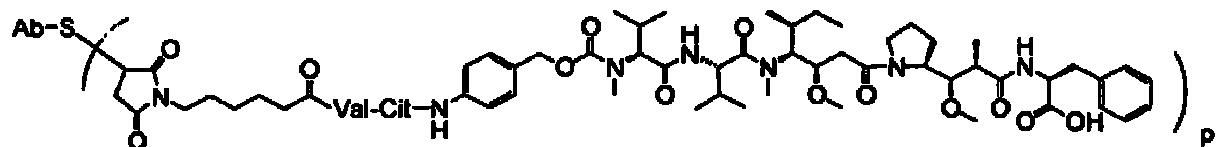


5

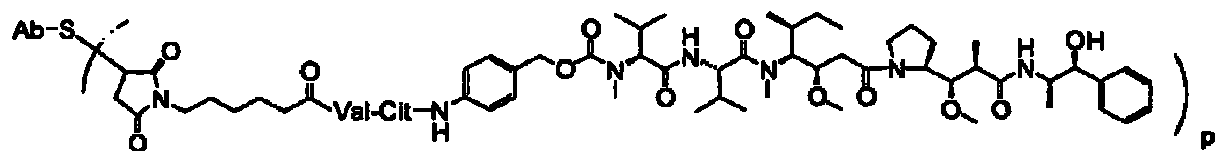
En un aspecto, los grupos hidrófilos incluyendo pero sin limitación, trietilenglicol ésteres (TEG), como se ha mostrado anteriormente, pueden unirse con el resto farmacológico en R¹¹. Sin quedar ligado a ninguna teoría particular, los grupos hidrófilos ayudan a la internalización y no aglomeración del resto farmacológico.

- 10 Se describen realizaciones ilustrativas de ADC de Fórmula que comprenden una auristatina/dolastatina o derivado de las mismas en el documento US 2005-0238649 A1 y Doronina *et al.* (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124. Las realizaciones ilustrativas de ADC de Fórmula I que comprende MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que "Ab" es un anticuerpo; p es de 1 a aproximadamente 8, "Val-Cit" es un dipéptido de valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre:

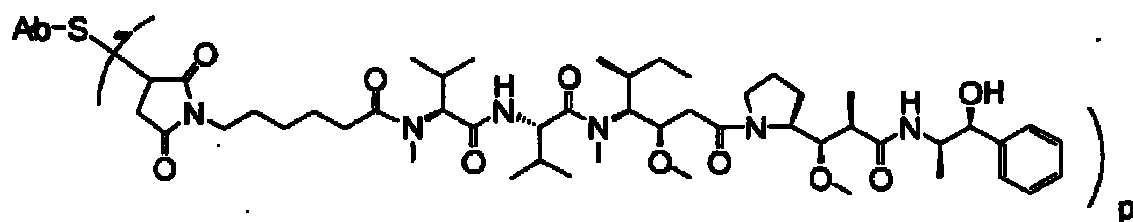
15



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

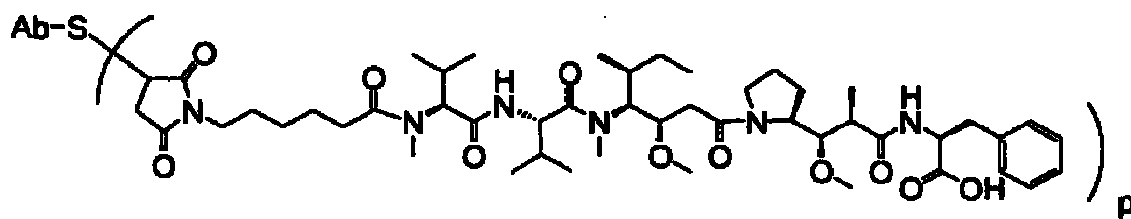


Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE

20

**Ab-MC-MMAF**

Las realizaciones ilustrativas de ADC de Fórmula I que comprenden MMAF y diversos componentes enlazadores incluyen además Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. Resulta interesante que se ha mostrado que los
 5 inmunconjugados que comprenden MMFA unido con un anticuerpo por un enlazador que no es proteolíticamente escindible poseen actividad comparable con inmunconjugados que comprenden MMAF unido con un anticuerpo por un enlazador proteolíticamente escindible. Véase, Doronina *et al.* (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124. En dichos casos, se cree que la liberación de fármacos se efectúa por degradación de anticuerpos en la célula. Misma referencia.

Normalmente, pueden prepararse restos farmacológicos basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase, E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química peptídica. Pueden prepararse restos
 15 farmacológicos de auristatina/dolastatina de acuerdo con los métodos de: documento US 2005-0238649 A1; Patente de Estados Unidos N° 5635483; Patente de Estados Unidos N° 5780588; Pettit *et al* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit *et al* (1998) AntiCancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* Synthesis, 1996, 719-725; Pettit *et al* (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863; y Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784.

En particular, pueden prepararse restos farmacológicos de auristatina/dolastatina de fórmula D_F, tales como MMAF y derivados de los mismos, usando métodos descritos en el documento US 2005-0238649 A1 y Doronina *et al.* (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124. Pueden prepararse restos farmacológicos de auristatina/dolastatina de fórmula D_E, tales como MMAE y derivados de los mismos, usando métodos descritos en Doronina *et al.* (2003) Nat. Biotech. 21: 778-784. Pueden sintetizarse convenientemente restos de enlazador-fármaco MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y MC-vc-PAB-MMAE por métodos rutinarios, por ejemplo, como se describen en Doronina *et al.* (2003) Nat. Biotech. 21: 778-784, y Publicación de Solicitud de Patente N° US 2005/0238649 A1, y después conjugarse con un anticuerpo de interés.

Carga farmacológica

La carga farmacológica se representa por p y es el número medio de restos farmacológicos por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga farmacológica puede variar de 1 a 20 restos farmacológicos (D) por anticuerpo. Los ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con una serie de restos farmacológicos, de 1 a 20. El número medio de restos farmacológicos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo de ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de ADC con respecto a p también puede determinarse. En algunos casos, puede conseguirse separación, purificación y caracterización de ADC homogéneo en el que p es un cierto valor de ADC con otras cargas farmacológicas por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede limitarse por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en las realizaciones ilustrativas anteriores, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos de tiol de cisteína, o puede tener solamente uno o varios grupos de tiol suficientemente reactivos mediante los cuales puede unirse un enlazador. En ciertas realizaciones, la mayor carga farmacológica, por ejemplo p > 5 puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga farmacológica para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 4; de aproximadamente 3,1 a aproximadamente 3,9; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,7; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,6; de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,8; o de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7. De hecho, se ha mostrado que para ciertos ADC, la relación óptima de restos farmacológicos por anticuerpo puede ser menor de 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Véase, documento US 2005-0238649 A1.

En ciertas realizaciones, se conjugan menos que el máximo teórico de restos farmacológicos con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, restos de lisina que no reaccionan con el intermedio enlazador-fármaco o reactivo enlazador, como se analiza posteriormente. Solamente los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de enlazador sensible a amina. Generalmente, los

anticuerpos no contienen muchos grupos de tiol de cisteína libres y reactivos que puedan enlazarse con un resto farmacológico; de hecho la mayoría de los restos de tiol de cisteína en anticuerpos existen como enlaces disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos de tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturizantes para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de diferentes maneras, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar de intermedio enlazador-fármaco o reactivo enlazador en relación con el anticuerpo, (ii) limitando el tiempo de reacción de conjugación o la temperatura, (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para modificación de tiol de cisteína, (iv) modificando por ingeniería genética mediante técnicas recombinantes la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de modo que el número y posición de los restos de cisteína se modifique para control del número y/o posición de uniones de fármaco-enlazador (tales como tioMab o tioFab preparados como se desvela en la presente memoria y en el documento WO2006/034488).

Debe entenderse que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio de enlazador-fármaco o reactivo enlazador seguido de reactivo de resto farmacológico, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos farmacológicos unidos a un anticuerpo. El número medio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla de un ensayo de anticuerpo de ELISA doble, que es específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Pueden identificarse moléculas de ADC individuales en la mezcla por espectroscopia de masas y separarse por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, Hamblett, K.J., *et al.* "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", N° de Resumen 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; Alley, S.C., *et al.* "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Resumen N° 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). En ciertas realizaciones, puede aislarse un ADC con un único valor de carga de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

Ciertos métodos para preparar inmunconjugados

Puede prepararse un ADC de Fórmula I por varias rutas empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen métodos ilustrativos para preparar un ADC de Fórmula I mediante esta última vía en el documento US 20050238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente memoria por referencia.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos de amina N-terminal, (ii) grupos de amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos de tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos de amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir enlaces de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotritol) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), de modo que el anticuerpo se reduzca total o parcialmente. Cada enlace de cisteína formará de este modo, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Como alternativa, pueden introducirse grupos sulfhidrilo en anticuerpos mediante modificación de restos de lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar restos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos de tiol reactivos en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos variantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

También producirse conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención mediante reacción entre un grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo en un reactivo enlazador o fármaco. Los grupos nucleófilos útiles en un reactivo enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrófilos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. En otra realización, los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos básicos de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo

que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un

resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

Los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidracida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con los siguientes reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos; véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

También pueden prepararse inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (*p*-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocionatobencil-3-metildietilentriaminopetaacético marcado en carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y partes citotóxicas del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en predirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

2. Inmunoconjugados ilustrativos - conjugados de fármaco y anticuerpo-tio

Preparación de anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína

Se prepara ADN que codifica una variante de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína y anticuerpos anti CD22 parentales por una diversidad de métodos que incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural), preparación por mutagénesis dirigida (o mediada por oligonucleótidos) (Carter (1985) *et al* Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443; Ho *et al* (1989) Gene (Amst.) 77: 51-59; Kunkel *et al* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu *et al* (1998) J. Biol. Chem. 273: 20252-20260), mutagénesis por PCR (Higuchi, (1990) en PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito *et al* (1991) Gene 102:67-70; Bernhard *et al* (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126-132; y Vallette *et al* (1989) Nuc. Acids Res. 17: 723-733) y mutagénesis de casete (Wells *et al* (1985) Gene 34: 315-323) de un ADN preparado previamente que codifica el polipéptido. Están disponibles en el mercado protocolos, kits y reactivos de mutagénesis, por ejemplo, Kit de Mutagénesis Directa de Múltiples Sitios QuikChange[®] (Stratagene, La Jolla, CA). También pueden generarse mutaciones individuales por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos usando ADN plasmídico bicatenario como molde por mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición; Zoller *et al* (1983) Methods Enzymol. 100: 468-500; Zoller, M. J. y Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10: 6487-6500). Pueden construirse variantes de anticuerpos recombinantes también mediante manipulación de fragmentos de restricción o por PCR de extensión solapante con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican el reemplazo o los reemplazos de codones de cisteína. Pueden emplearse técnicas de mutagénesis convencionales para generar ADN que codifica dichos anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína mutantes (Sambrook *et al* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; y Ausubel *et al* Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, N. Y., 1993).

Puede usarse tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al* (1990) Nature 348: 552-553) para producir anticuerpos humanos anti CD22 y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio

variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en fase en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B (Johnson *et al* (1993) Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571; Clackson *et al* (1991) Nature, 352: 624-628; Marks *et al* (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597; Griffith *et al* (1993) EMBO J. 12: 725-734; documentos US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Pueden sintetizarse químicamente anticuerpos anti CD22 usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. La secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, puede producirse por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (1969) W. H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154). Puede realizarse síntesis proteica *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. Puede conseguirse síntesis de fase sólida automática, por ejemplo, empleando aminoácidos protegidos con Fmoc o *t*-BOC y usando un sintetizador peptídico de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente diversas partes del anticuerpo anti CD22 o polipéptido de CD22 por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti CD22 o polipéptido del CD22 deseado.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (Morimoto *et al* (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117; y Brennan *et al* (1985) Science, 229: 81) o se produjeron directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo anti CD22 Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden aislarse fragmentos de anticuerpo de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas en la presente memoria. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al* (1992) Bio/Technology 10: 163-167) o aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. El anticuerpo anti CD22 puede ser un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) (documentos WO 93/16185; US 5571894; US. 5587458). El fragmento de anticuerpo anti CD22 también puede ser un "anticuerpo lineal" (documento US 5641870). Dichos fragmentos del anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

La descripción a continuación se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti CD22 cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico codificante de anticuerpo anti CD22. El ADN que codifica anticuerpos anti CD22 puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir del tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti CD22 y que lo expresa a un nivel detectable. En consecuencia, el ADN de polipéptido CD22 o anticuerpo anti CD22 humano puede obtenerse convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica anticuerpo anti CD22 también puede obtenerse de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácido nucleico automática).

Los métodos de diseño, selección y preparación permiten anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína que son reactivos con funcionalidad electrófila. Estos métodos permiten además compuestos conjugados con anticuerpo tales como compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) con moléculas farmacológicas en sitios designados, diseñados, selectivos. Los restos de cisteína reactivos en una superficie de anticuerpo permiten conjugar específicamente un resto farmacológico mediante un grupo reactivo de tiol tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad de tiol de un resto de Cys con un grupo de maleimida es aproximadamente 1000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de restos de lisina del grupo amino N terminal. La funcionalidad específica de tiol en reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren pH mayor (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres). La cantidad de tiol libre en una proteína puede estimarse por el ensayo convencional de Ellman. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero ligado a disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con enlaces disulfuro internos que unen las subunidades entre sí. En proteínas tales como estas, se requiere reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditioneitol (DTT) o selenol (Singh *et al* (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156) para generar el tiol libre reactivo. Este enfoque puede dar como resultado pérdida de estructura terciaria y especificidad de unión a antígeno del anticuerpo.

El ensayo de Pheselector (ELISA de Fagos para Selección de Tioles Reactivos) permite la detección de grupos de cisteína reactivos en anticuerpos en un formato de fago de ELISA ayudando de este modo al diseño de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína (documento WO 2006/034488). El anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se usa para recubrir superficies de pocillos, seguido de incubación con partículas de fago, adición de anticuerpo secundario marcado con HRP y detección de absorbancia. Las proteínas mutantes presentadas en fagos pueden explorarse de una manera rápida, robusta y de alto rendimiento. Pueden producirse bibliotecas de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína y someterse a selección de unión usando

el mismo enfoque para identificar de forma apropiada sitios reactivos de incorporación de Cys libre de bibliotecas de fagos-proteína aleatorias de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye hacer reaccionar proteínas mutantes para cisteína presentadas en fagos con un reactivo de afinidad o grupo indicador que también es reactivo a tiol.

- 5 El ensayo de PHESELECTOR permite la exploración de grupos de tiol reactivos en anticuerpos. La identificación de la variante A121C por este método es ilustrativa. La molécula Fab completa puede buscarse eficazmente para identificar más variantes de TioFab con grupos tiol reactivos. Se empleó un parámetro, accesibilidad de superficie fraccional, para identificar y modificar la accesibilidad del disolvente a los restos de aminoácidos en un polipéptido. La accesibilidad de superficie puede expresarse como el área de superficie ($\text{\AA}^2$) que puede ponerse en contacto con una molécula de disolvente, por ejemplo agua. El espacio ocupado de agua es aproximadamente como una esfera de 1,4 $\text{\AA}$ de radio. Está disponible libremente o puede licenciarse software (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, Fax: (+44) 1925 603825, o por Internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) como el grupo CCP4 de programas de cristalografía que emplea algoritmos para calcular la accesibilidad de superficie de cada aminoácido de una proteína con coordenadas derivadas de cristalografía de rayos x conocidas ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50: 760-763). Dos módulos de software ilustrativos que realizan cálculos de accesibilidad de superficie son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B. Lee y F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55: 379-400. AREAIMOL define la superficie accesible al disolvente de una proteína como el locus del centro de una esfera sonda (que representa una molécula de disolvente) a medida que rueda sobre la superficie de Van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula el área de superficie accesible al disolvente generando puntos de superficie en una esfera extendida sobre cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma de los radios del átomo y la sonda) y eliminando los que quedan dentro de esferas equivalentes asociadas con átomos cercanos. AREAIMOL encuentra el área accesible del disolvente de átomos en un archivo de coordenadas de PDB, y resume el área accesible por resto, por cadena y para la molécula completa. Las áreas accesibles (o diferencias de áreas) para átomos individuales pueden escribirse en un archivo de salida pseudo PDB. AREAIMOL asume un único radio para cada elemento, y solamente reconoce un número limitado de elementos diferentes.

AREAIMOL y SURFACE presentan accesibilidades absolutas, es decir el número de Angstroms (A) cuadrados. La accesibilidad de superficie fraccional se calcula por referencia a un estado patrón relevante para un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es el tripéptido Gly-X-Gly, en el que X es el aminoácido de interés, y el estado de referencia debería ser una conformación "extendida", es decir como las de cadenas beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área accesible calculada se divide por el área accesible en un estado de referencia de tripéptido Gly-X-Gly y presenta el cociente, que es la accesibilidad fraccional. El porcentaje de accesibilidad es la accesibilidad fraccional multiplicada por 100. Otro algoritmo ilustrativo para calcular la accesibilidad de superficie se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basilea) que calcula la accesibilidad fraccional de un resto de aminoácido a una esfera de agua basándose en las coordenadas de rayos x del polipéptido. La accesibilidad de superficie fraccional para cada aminoácido en un anticuerpo puede calcularse usando información de estructura cristalina disponible (Eigenbrot *et al.* (1993) J Mol Biol. 229: 969-995).

40 El ADN que codifica los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que se transfectan después en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), u otras células hospedadoras de mamífero tales como células de mieloma (documentos US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que no producen de otro modo la proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes.

50 Después del diseño y selección, pueden producirse anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo TioFab, con los restos de Cys no emparejados altamente reactivos introducidos por ingeniería genética mediante: (i) expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo de *E. coli* (Skerra *et al* (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5: 256-262; Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188) o un sistema de cultivo de células de mamífero (documento WO 01/00245), por ejemplo células de Ovario de Hámster Chino (CHO); y (ii) purificación usando técnicas de purificación de proteínas habituales (Lowman *et al* (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988).

60 Los grupos tiol de Cys introducida por ingeniería genética reaccionan con reactivos enlazadores electrófilos e intermedios de enlazador-fármaco para formar conjugados de fármaco y anticuerpo modificados por ingeniería genética con cisteína y otros anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína marcados. Los restos de Cys de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, y presentes en los anticuerpos parentales, que se emparejan y forman enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios no tienen ningún grupo tiol reactivo (a no ser que se traten con un agente reductor) y no reaccionan con reactivos enlazadores electrófilos o intermedios de enlazador-fármaco. El resto de Cys recién introducido por ingeniería genética, puede permanecer no emparejado, y ser capaz de reaccionar con, es decir conjugar con, un reactivo enlazador electrófilo o intermedio de enlazador-fármaco, tal como fármaco-maleimida. Los intermedios de enlazador-fármaco ilustrativos incluyen: MC-MMAE, MC-

MMAF, MC-vc-PAB-MMAE y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones estructurales de los restos de Cys introducidos por ingeniería genética de las cadenas pesada y ligera se numeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se correlaciona con el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) que comienza en el extremo N terminal, y difiere del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) por inserciones indicadas por a, b, c. Usando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Los sitios variantes de cadena pesada modificada por ingeniería genética con cisteína se identifican por la numeración secuencial y los esquemas de numeración de Kabat.

En una realización, el anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara por un procedimiento que comprende:

- (a) reemplazar uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo anti CD22 parental por cisteína; y
- (b) determinar la reactividad de tiol del anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína haciendo reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo sensible a tiol.

El anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo sensible a tiol.

Los restos de aminoácidos de cisteína libre pueden localizarse en las cadenas pesada o ligera, o en los dominios constantes o variables. Los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo Fab, también pueden obtenerse por ingeniería genética con uno o más aminoácidos de cisteína reemplazando aminoácidos del fragmento de anticuerpo, para formar fragmentos de anticuerpo modificados por ingeniería genética con cisteína.

También se describe un método para preparar (realizar) un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, que comprende:

- (a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo anti CD22 parental para generar el anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína; y
- (b) determinar la reactividad de tiol del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo sensible a tiol;

en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo sensible a tiol.

La etapa (a) del método para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender:

- (i) mutar una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;
- (ii) expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; y
- (iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.

La etapa (b) del método para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en una partícula viral seleccionada de un fago o una partícula de fagémido.

La etapa (b) del método para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína también puede comprender:

- (i) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad sensible a tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad; y
- (ii) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad con un medio de captura.

Otro ejemplo es un método para explorar anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína con aminoácidos de cisteína no emparejados altamente sensibles para reactividad de tiol que comprende:

- (a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo parental para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;

(b) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad sensible a tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad;

(c) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad con un medio de captura; y

(d) determinar la reactividad de tiol del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con el reactivo sensible a tiol.

La etapa (a) del método de exploración de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína puede comprender:

(i) mutar una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;

(ii) expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; y

(iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.

La etapa (b) del método para explorar anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en una partícula viral seleccionada de un fago o una partícula de fagémido.

La etapa (b) del método para explorar anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína también puede comprender:

(i) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad sensible a tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad; y

(ii) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad con un medio de captura.

Modificación por ingeniería genética con cisteína de variantes de IgG 10F4 anti CD22

Se introdujo cisteína en el sitio 118 de cadena pesada (numeración EU) (equivalente a la posición 121 de cadena pesada, numeración secuencial) en los anticuerpos anti CD22 monoclonales parentales quiméricos de longitud completa por los métodos de ingeniería genética de cisteína descritos en la presente memoria.

El anticuerpo parental, "Hu 10F4v3 Fc anti CD22 convencional" (secuencia de Cadena Pesada: SEC ID N°: 88, secuencia de Cadena Ligera: SEC ID N°: 87, Figura 5B) se modificó por ingeniería genética con cisteína para proporcionar "A118C tio hu 10F4v3 anti CD22" (secuencia de Cadena Pesada: SEC ID N°: 92, secuencia de Cadena Ligera: SEC ID N°: 91, Figure 17), "S400C tio hu 10F4v3 anti CD22" (secuencia de Cadena Pesada: SEC ID N°: 93, secuencia de Cadena Ligera: SEC ID N°: 91, Figure 17), o "V205C tio 10F4v3 anti CD22" (secuencia de Cadena Pesada: SEC ID N°: 88, secuencia de Cadena Ligera: SEC ID N°: 91, Figuras 5B y 17).

Estos anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética con cisteína se expresaron en células CHO (Ovario de Hámster Chino) por fermentación transitoria en medio que contenía cisteína 1 mM.

Anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína marcados

Los anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína pueden acoplarse de forma específica de sitio y eficazmente con un reactivo sensible a tiol. El reactivo sensible a tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo de captura, es decir de afinidad, marcador (por ejemplo un reactivo enlazador-biotina), un marcador de detección (por ejemplo, un reactivo de fluoróforo), un reactivo de inmovilización en fase sólida (por ejemplo SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio) o un intermedio de enlazador-fármaco. Un ejemplo de un reactivo sensible a tiol es *N*-etil maleimida (NEM). En una realización ilustrativa, la reacción de un TioFab con un reactivo de enlazador-biotina proporciona un TioFab biotinilado por el que puede detectarse y medirse la presencia y reactividad del resto de cisteína introducido por ingeniería genética. La reacción de un TioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un TioFab con un enlazador funcionalizado que puede hacerse reaccionar adicionalmente con un reactivo de restos farmacológico u otro marcador. La reacción de un TioFab con un intermedio de enlazador-fármaco proporciona un conjugado de fármaco TioFab.

Los métodos ilustrativos descritos en la presente memoria pueden aplicarse en general a la identificación y producción de anticuerpos, y más generalmente, a otras proteínas mediante aplicación de las etapas de diseño y exploración descritas en la presente memoria.

Dicho enfoque puede aplicarse a la conjugación de otros reactivos sensibles a tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodaacetamida, un disulfuro de piridilo, u otro compañero de conjugación sensible a tiol (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). El reactivo sensible a tiol puede ser un resto farmacológico, un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para un metal radioterapéutico o de formación de imágenes, un marcador peptídico o no peptídico o marcador de detección, o un agente modificador de la eliminación tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro carbohidrato o agente lipófilo.

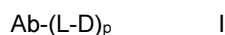
Usos de anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína

Los anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína, y conjugados de los mismos, pueden encontrar uso como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. La presente divulgación proporciona además métodos para prevenir, manipular, tratar o aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno relacionado con linfocitos B. En particular, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir, manipular, tratar o aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer, por ejemplo, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto. La presente divulgación proporciona además métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con CD22 o predisposición a desarrollar dicho trastorno, así como métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, que preferentemente se unen a polipéptidos CD22 asociados con linfocitos B.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible a un trastorno relacionado con linfocitos B.

Conjugados farmacológicos del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína (conjugados de fármaco y anticuerpo-tio)

Otro aspecto de la divulgación es un compuesto de conjugado de fármaco-anticuerpo que comprende un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína (Ab) y un resto farmacológico de auristatina (D) en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína está unido mediante uno o más aminoácidos de cisteína libres por un resto enlazador (L) con D; teniendo el compuesto Fórmula I:



en la que p es 1, 2, 3 o 4; y en la que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara por un procedimiento que comprende reemplazar uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo anti CD22 parental por uno o más aminoácidos de cisteína libres.

La Figura 10 muestra realizaciones de conjugados de fármaco y anticuerpo anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína (ADC) en las que un resto farmacológico de auristatina está unido a un grupo de cisteína introducido por ingeniería genética en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).

Las ventajas potenciales de conjugados de fármaco y anticuerpo anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína incluyen mejor seguridad (mayor índice terapéutico), mejores parámetros PK, se conservan los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo que pueden estabilizar el conjugado y conservan su conformación de unión activa, se definen los sitios de conjugación farmacológica y la preparación de los conjugados de fármaco y anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de conjugación de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína con reactivos de enlazador-fármaco da como resultado un producto más homogéneo.

Enlazadores

“Enlazador”, “Unidad Enlazadora” o “eslabón” significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo con un resto farmacológico. En diversas realizaciones, un enlazador se especifica como L. Un “Enlazador” (L) es un resto bifuncional o multifuncional que puede usarse para unir uno o más restos farmacológicos (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) pueden prepararse convenientemente usando un enlazador que tenga funcionalidad reactiva para unión con el Fármaco y con el Anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo de un reactivo enlazador, un resto farmacológico o un intermedio de enlazador-fármaco.

En un aspecto, un Enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a una cisteína nucleófila presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un enlazador y forma un enlace covalente con un enlazador. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos de maleimida y haloacetamida.

Los enlazadores incluyen un radical divalente tal como un alquildilo, un arileno, un heteroarileno, restos tales como: $-(\text{CR}_2)_n\text{O} (\text{CR}_2)_n-$, unidades repetidas de alquiloxi (por ejemplo polietileno, PEG, polimetileno) y alquilamino (por ejemplo polietileno, Jeffamine™); un éster diácido y amidas incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína reaccionan con reactivos enlazadores o intermedios de enlazador-fármaco, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α -halocarbonilo, de acuerdo con el método de conjugación en la página 766 de Klussman, *et al* (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773, y de acuerdo con el protocolo del Ejemplo x.

El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ilustrativos incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe" o "af"), *p*-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), *N*-succinimidil 4-(2-piridil) pentanoato ("SPP"), *N*-succinimidil 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), *N*-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato ("SIAB"), etileno- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ - como una o más unidades repetidas ("EO" o "PEO"). Se conocen componentes enlazadores adicionales en la técnica y algunos se describen en la presente memoria.

En una realización, el enlazador L de un ADC tiene la fórmula:



en la que:

-A- es una unidad extensora unida covalentemente con un tiol de cisteína del anticuerpo (Ab); a es 0 o 1;

cada -W- es independientemente una unidad de Aminoácidos;

w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;

-Y- es una unidad Espaciadora unida covalentemente con el resto farmacológico; y

y es 0, 1 o 2.

Unidad Extensora

La unidad Extensora (-A-), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpo con una unidad de aminoácidos (-W-). A este respecto un anticuerpo (Ab) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de un Extensor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, bien de forma natural o bien mediante manipulación química incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. En un aspecto, los grupos funcionales y de anticuerpo son sulfhidrilo o amino. Pueden generarse grupos sulfhidrilo por reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un anticuerpo. Como alternativa, pueden generarse grupos sulfhidrilo por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un anticuerpo usando 2-iminotiolano (reactivos de Traut) y otro reactivo generador de sulfhidrilo. En una realización, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo de una unidad extensora. Se representan unidades extensoras ilustrativas en conjugados de Fórmula I por Fórmulas II y III, en las que Ab-, -W-, -Y-, -D, w y y son como se ha definido anteriormente, y R^{17} es un radical divalente seleccionado de $(\text{CH}_2)_r$, $\text{C}_3\text{-C}_8$ carbociclilo, $\text{O-(CH}_2)_r$, arileno, $(\text{CH}_2)_r$ -arileno, -arileno- $(\text{CH}_2)_r$, $(\text{CH}_2)_r$ -(carbociclilo $\text{C}_3\text{-C}_8$), (carbociclilo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-(CH₂)_r, heterociclilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, (CH₂)_r-(heterociclilo $\text{C}_3\text{-C}_8$), -(heterociclilo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-(CH₂)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r, -(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r; en las que R^b es H, alquilo C₁-C₆, fenilo, o bencilo; y r es independientemente un número entero que varía de 1 a 10.

El arileno incluye radicales de hidrocarburos aromáticos divalentes de 6-20 átomos de carbono derivados por la retirada de dos átomos de hidrógeno del sistema de anillo aromático. Los grupos de arileno típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

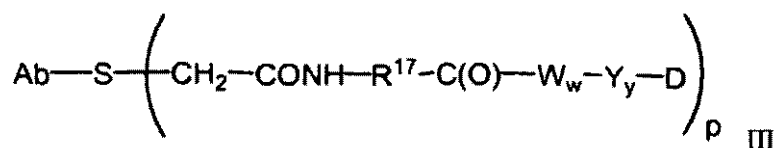
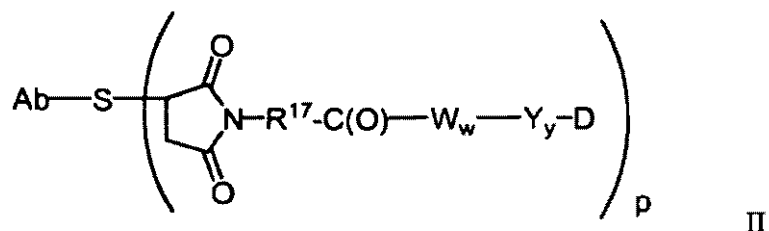
Los grupos heterociclilo incluyen un sistema de anillo en el que uno o más átomos de anillo son un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical de heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros de anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tenga de

7 a 10 miembros de anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta el presente), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

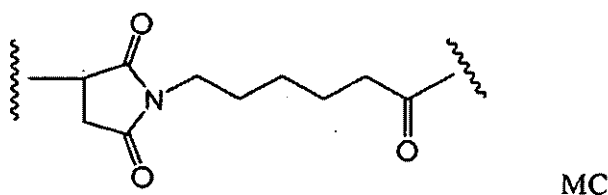
Los ejemplos de heterociclos incluyen como ejemplo y sin limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazol, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triacinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiacinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, piracinilo, piridacinilo, indolicinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolicinilo, ftalacinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4Ah-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenacinilo, fenotiacinilo, furazanilo, fenoxacinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperacinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoilo.

Los grupos de carbociclilo incluyen un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de carbono, aún más normalmente 5 o 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo dispuestos como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o de 9 a 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

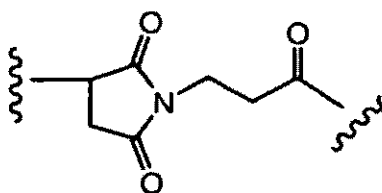
Debe entenderse a partir de todas las realizaciones ilustrativas de ADC de Fórmula I tales como II-VI, que incluso cuando no se indique expresamente, de 1 a 4 restos farmacológicos están unidos con un anticuerpo ($p = 1-4$), dependiendo del número de restos de cisteína introducidos por ingeniería genética.



Una unidad Extensora de Fórmula II ilustrativa se deriva de maleimidocaproilo (MC) en la que R^{17} es $-(\text{CH}_2)_5-$:

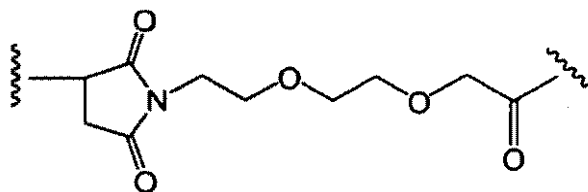


Una unidad Extensora ilustrativa de Fórmula II deriva de maleimido-propanoilo (MP) en la que R^{17} es $-(\text{CH}_2)_2-$:



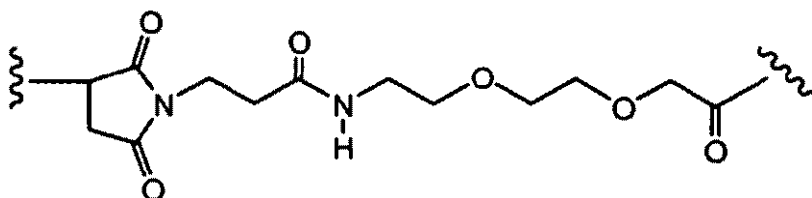
MP

Otra unidad Extensora ilustrativa de Fórmula II en la que R^{17} es $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y r es 2:



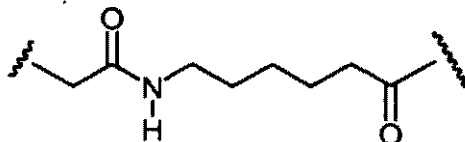
5

Otra unidad Extensora ilustrativa de Fórmula II en la que R^{17} es $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ en la que R^b es H y cada r es 2:



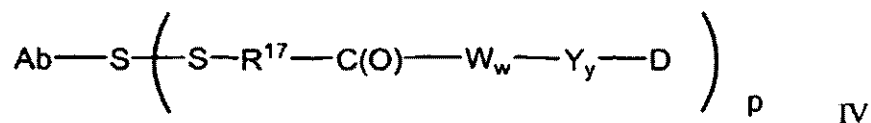
MPEG

10 Una unidad Extensora ilustrativa de Fórmula III en la que R^{17} es $-(CH_2)_5-$:



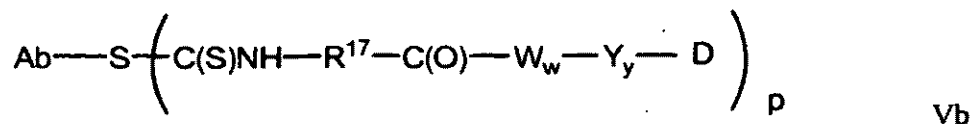
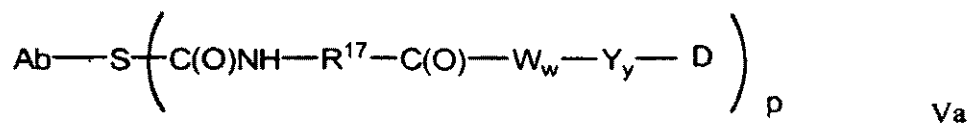
En otra realización, la unidad Extensora está unida con el anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína mediante un enlace disulfuro entre el átomo de azufre de cisteína introducida por ingeniería genética del anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad Extensora. Se representa una unidad Extensora representativa de la presente realización por Fórmula IV, en la que R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w y y son como se ha definido anteriormente.

15



En otra realización más, el grupo reactivo del Extensor contiene un grupo funcional sensible a tior que puede formar un enlace con un tior de cisteína libre de un anticuerpo. Los ejemplos de grupos funcionales de reacción a tior incluyen, pero sin limitación, maleimida, α -haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Se representan unidades extensoras representativas de la presente realización por las Fórmulas Va y Vb, en las que $-R^{17}$ -, Ab-, -W-, -Y-, -D, w y y son como se ha definido anteriormente;

25

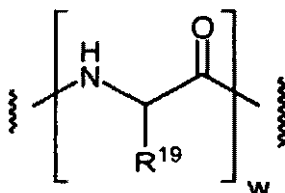


En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para unión covalente de más de un resto farmacológico mediante un resto enlazador multifuncional, ramificado, con un anticuerpo (Sun *et al* (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215; Sun *et al* (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43: 1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco y anticuerpo, es decir carga, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína porta solamente un grupo de tiol de cisteína reactivo, puede unirse una multitud de restos farmacológicos mediante un enlazador dendrítico.

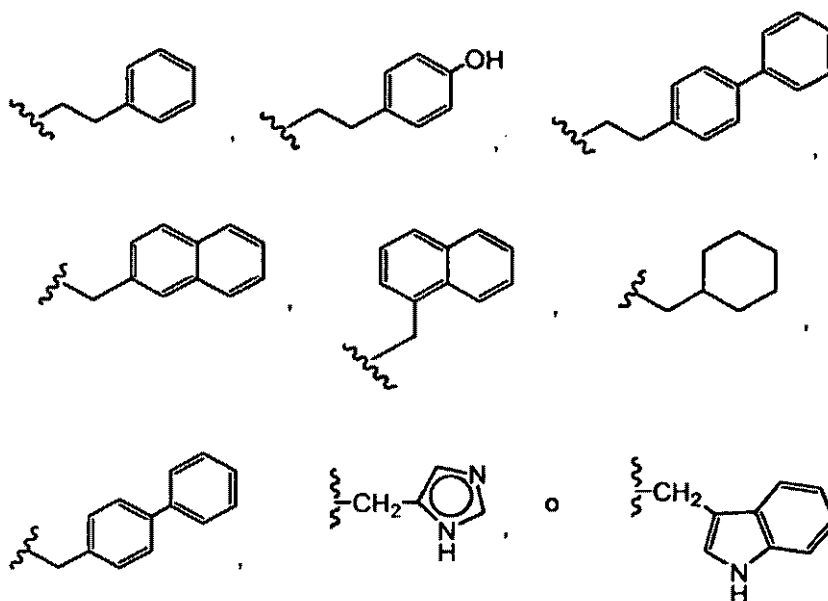
Unidad de aminoácidos

El enlazador puede comprender restos de aminoácidos. La unidad de Aminoácidos (-W_w-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) con el resto farmacológico (D) del conjugado de fármaco-anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína (ADC) de la invención.

-W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los restos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácidos incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Cada unidad de -W- independientemente tiene la fórmula indicada posteriormente entre corchetes y w es un número entero que varía de 0 a 12:



en la que R¹⁹ es hidrógeno metilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,



Cuando R^{19} es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que está unido R^{19} es quiral. Cada átomo de carbono con el que está unido R^{19} está independientemente en la configuración (S) o (R), o una mezcla racémica. Las unidades de aminoácidos pueden por lo tanto ser enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

Las unidades de Aminoácidos $-W_w$ ilustrativas incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ilustrativos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ilustrativos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina.

La unidad de Aminoácidos puede escindirse enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a tumor, para liberar el resto farmacológico $(-D)$, que en una realización está protonado *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D) . Pueden diseñarse y optimizarse componentes enlazadores de aminoácidos en su selectividad por escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Unidad espaciadora

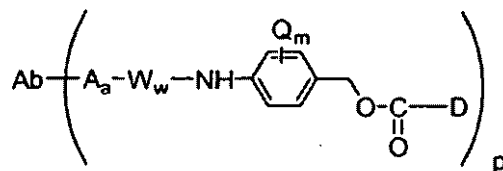
La unidad Espaciadora $(-Y_-)$, cuando está presente ($y = 1$ o 2), une una unidad de Aminoácidos $(-W_w)$ con el resto farmacológico (D) cuando está presente una unidad de Aminoácidos ($w = 1-12$). Como alternativa, la unidad Espaciadora une la unidad Extensora con el resto farmacológico cuando está ausente la unidad de Aminoácidos. La unidad Espaciadora también une el resto farmacológico con la unidad de anticuerpo cuando tanto la unidad de Aminoácidos como la unidad Extensora están ausentes ($w, y = 0$). Las unidades Espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmoladoras y no autoinmoladoras. Una unidad Espaciadora no autoinmoladora es una en la que parte de o toda la unidad Espaciadora permanece unida al resto farmacológico después de escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácidos del conjugado de fármaco-anticuerpo. O el enlazador-resto farmacológico. Cuando un ADC que contiene una unidad Espaciadora de glicina-glicina o una unidad Espaciadora de glicina se somete a escisión enzimática mediante una proteasa asociada a célula tumoral, una proteasa asociada a célula cancerosa o una proteasa asociada a linfocito, se escinde un resto farmacológico-glicina-glicina o un resto farmacológico-glicina de $Ab-A_a-W_w$. En una realización, tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana, que escinde el enlace del resto farmacológico-glicina y libera el fármaco.

En otra realización, $-Y_-$ es una unidad de *p*-aminobencilcarbamoilo (PAB) cuya parte de fenileno está sustituida con Q_m en la que Q es $-\text{alquilo } C_{1-8}$, $-\text{O}-(\text{alquilo } C_{1-8})$, $-\text{halógeno}$, $-\text{nitro}$ o $-\text{ciano}$; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

Son realizaciones ilustrativas de una unidad Espaciadora no autoinmoladora $(-Y_-)$: $-\text{Gly-Gly-}$; $-\text{Gly-}$; $-\text{Ala-Phe-}$; $-\text{Val-Cit-}$.

En una realización, se proporciona un enlazador-resto Farmacológico o un ADC en el que la unidad Espaciadora está ausente ($y=0$), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

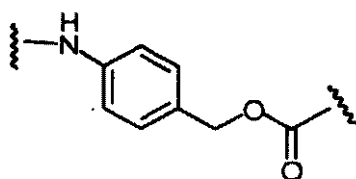
Como alternativa, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmoladora puede liberar -D. En una realización, -Y- es un grupo de PAB que está unido a -W_w- mediante el átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente con -D mediante un grupo de carbonato, carbamato o éter, en el que el ADC tiene la estructura ilustrativa:



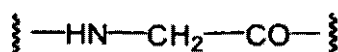
en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; y p varía de 1 a 4.

Otros ejemplos de espaciadores autoinmoladores incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay *et al.* (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237), análogos de PAB heterocíclicos (documento US 2005/0256030), beta-glucurónido (documento WO 2007/011968) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que se someten a ciclación tras hidrólisis de enlace de amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues *et al.* (1995) Chemistry Biology 2: 223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos de forma apropiada (Storm *et al.* (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, *et al.* (1990) J. Org. Chem. 55: 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que se sustituyen en la glicina (Kingsbury *et al.* (1984) J. Med. Chem. 27: 1447) también son ejemplos de espaciador autoinmolador útil en los ADC.

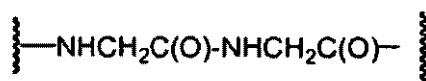
Se representan unidades Espaciadoras ilustrativas (-Y_y-) por las Fórmulas X-XII:



X



XI

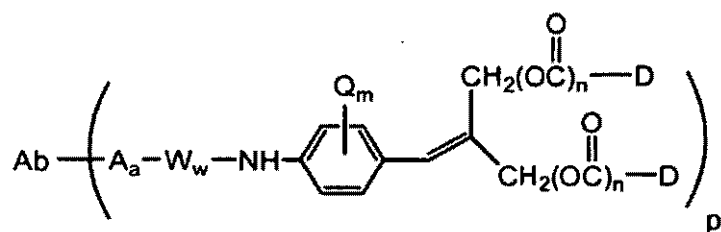


XII

Enlazadores dendríticos

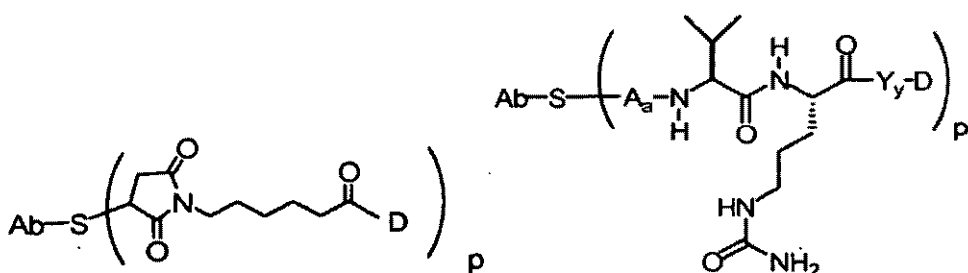
En otra realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para unión covalente de más de un resto farmacológico mediante un resto enlazador multifuncional, ramificado, con un anticuerpo (Sun *et al.* (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215; Sun *et al.* (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco y anticuerpo, es decir la carga, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína porta solamente un grupo tiol de cisteína reactivo, puede unirse una multitud de restos farmacológicos mediante un enlazador dendrítico. Las realizaciones ilustrativas de enlazadores dendríticos ramificados incluyen unidades de dendrímero de 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (documento WO 2004/01993; Szalai *et al.* (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125: 15688-15689; Shamis *et al.* (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126: 1726-1731; Amir *et al.* (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4494-4499).

En una realización, la unidad Espaciadora es un bis(hidroximetil)estireno ramificado (BHMS), que puede usarse para incorporar y liberar múltiples fármacos, que tienen la estructura:



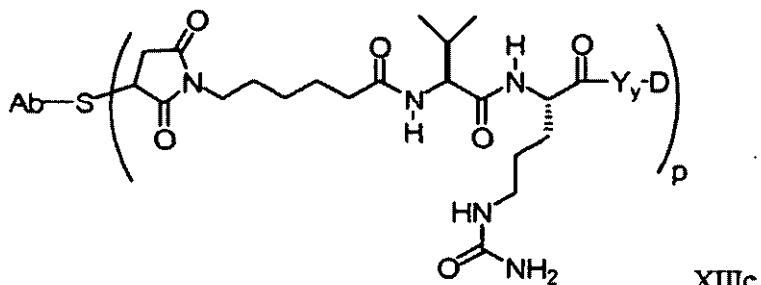
que comprende una unidad dendrímica de 2-(4-aminobenciliden)propano-1,3-diol (documento WO 2004/043493; de Groot *et al* (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4490-4494), en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a 4.

Las realizaciones ilustrativas de los compuestos de conjugado de fármaco-anticuerpo de Fórmula I incluyen XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit), y XIId (MC-val-cit-PAB):

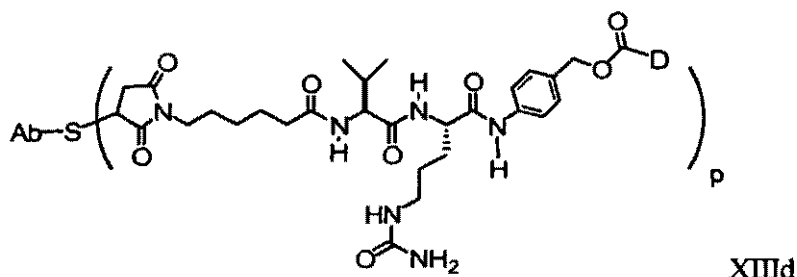


XIIIa

XIIIb



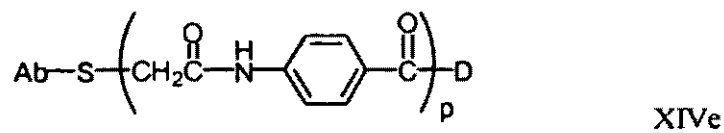
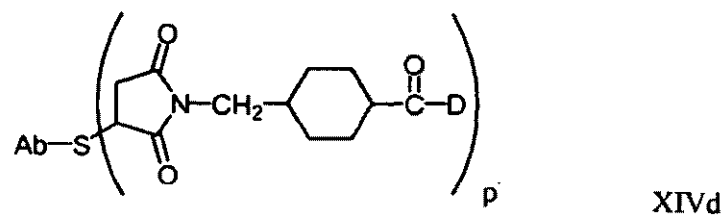
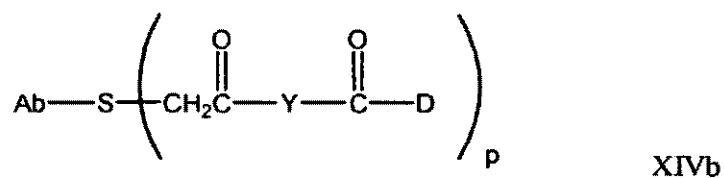
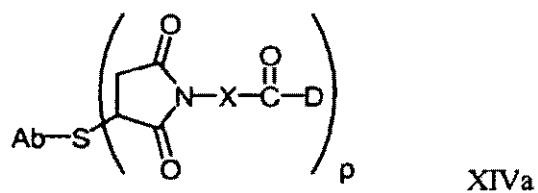
XIIIc



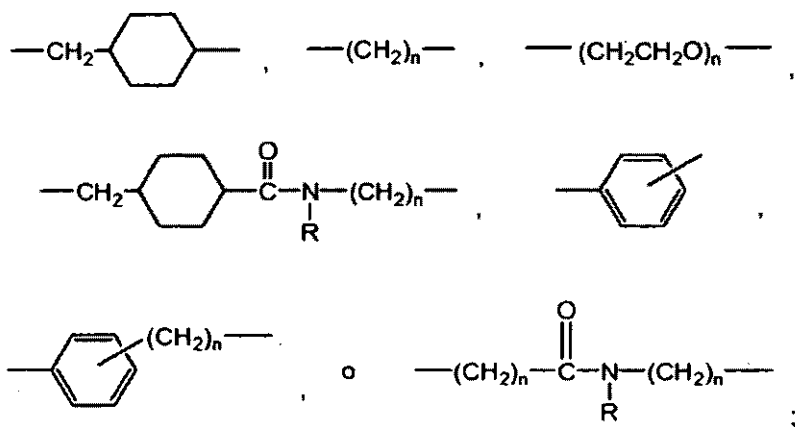
XIId

10

Otras realizaciones ilustrativas de los compuestos de conjugado de fármaco-anticuerpo de Fórmula I incluyen XIVa-e:

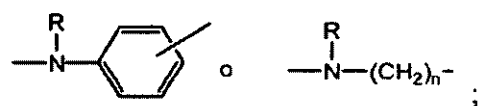


en las que X es:



5

Y es:



y R es independientemente H o alquilo C₁-C₆; y n es de 1 a 12.

En otra realización, un Enlazador tiene un grupo funcional reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un Enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un enlazador incluyen, pero sin limitación, hidracida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidracida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para unión con un enlazador.

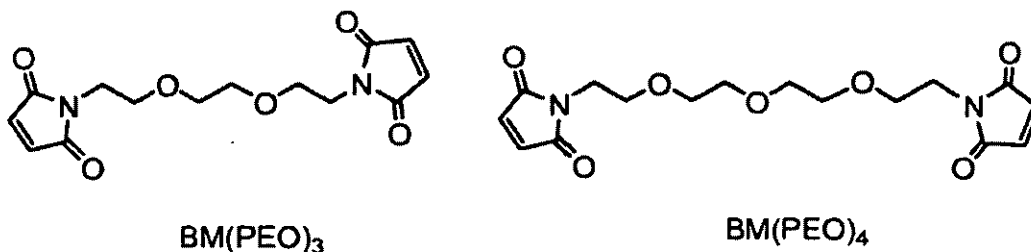
Normalmente, pueden prepararse enlazadores de tipo peptídico formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Pueden ensamblarse intermedios enlazadores con cualquier combinación o secuencia de reacciones incluyendo unidades Espaciadoras, Extensoras y de Aminoácidos. Las unidades Espaciadoras, Extensoras y de Aminoácidos pueden emplear grupos funcionales reactivos que son de naturaleza electrófila, nucleófila o de radicales libres. Los grupos funcionales reactivos incluyen, pero sin limitación, carboxilos, hidroxilos, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y grupos salientes, tales como O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, -I; o maleimida.

En otra realización, el Enlazador puede estar sustituido con grupos que modulan la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el anticuerpo o el resto farmacológico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (intermedio de enlazador-anticuerpo) con D, o D-L (intermedio de enlazador-fármaco) con Ab, dependiendo de la vía de la síntesis empleada para preparar el ADC.

Reactivos enlazadores

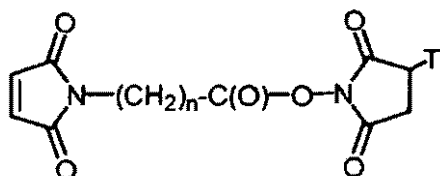
Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y auristatina usando una diversidad de reactivos enlazadores bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (*p*-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene).

Los conjugados de fármaco y anticuerpo también pueden prepararse con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), e incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃, y BM(PEO)₄, que están disponibles en el mercado de Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P. O. Box 117, Rockford, IL. 61105 Estados Unidos, Estados Unidos 1-800-874-3723, Internacional +815-968-0747. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo de tior de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un resto farmacológico que contiene tior, marcador o intermedio enlazador, de una manera secuencial o simultánea. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo de tior de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, resto farmacológico, marcador o intermedio enlazador incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, piridil disulfuro, isocianato e isotiocianato.

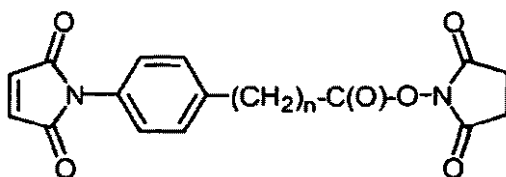


También pueden obtenerse reactivos enlazadores útiles mediante otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con procedimientos descritos en Toki *et al* (2002) J. Org. Chem. 67: 1865-1872; Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60: 5352-5355; Frisch *et al* (1996) Bioconjugate Chem. 7: 180-186; documentos US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

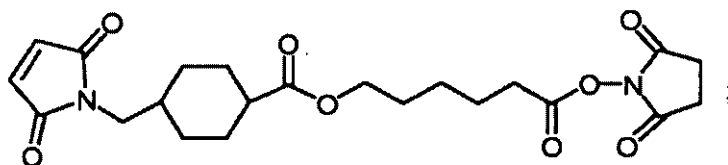
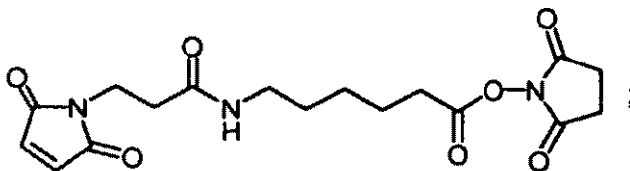
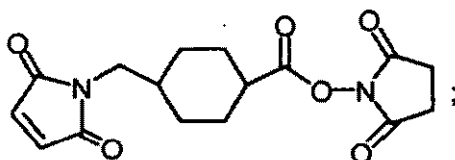
Pueden introducirse extensores de fórmula (IIIa) en un Enlazador haciendo reaccionar los siguientes reactivos enlazadores con el extremo N terminal de una unidad de Aminoácidos:



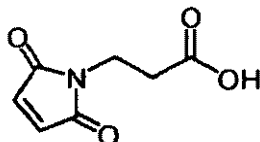
5 en la que n es un número entero que varía de 1 a 10 y T es -H o -SO₃Na;



10 en la que n es un número entero que varía de 0 a 3;

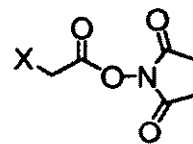
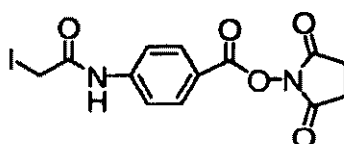
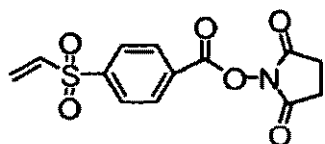


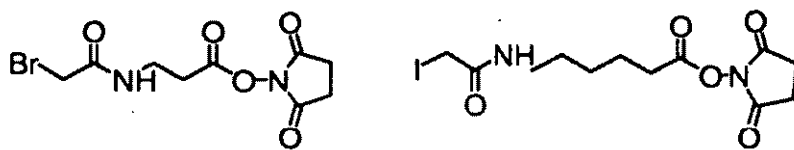
15 y



Pueden introducirse unidades extensoras en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N terminal de una unidad de Aminoácidos:

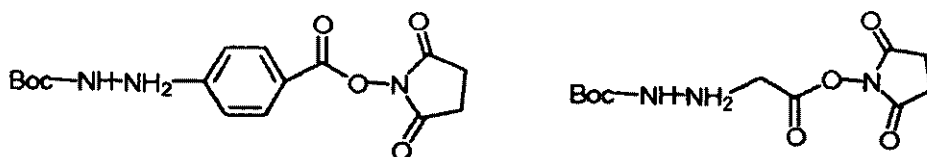
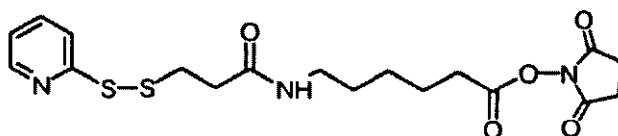
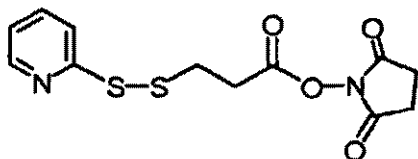
20



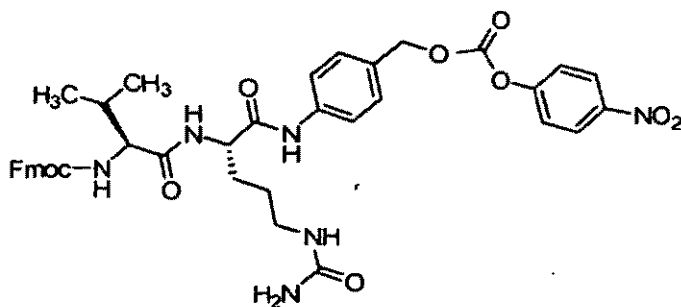


en los que X es Br o I.

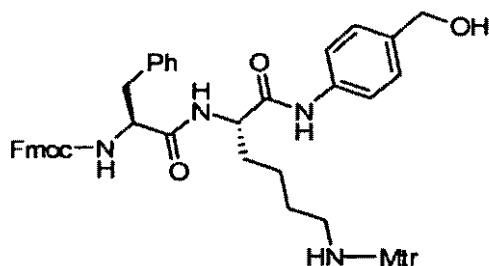
- 5 También pueden introducirse unidades extensoras de fórmula en un Enlazador haciendo reaccionar los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N de una unidad de Aminoácidos:



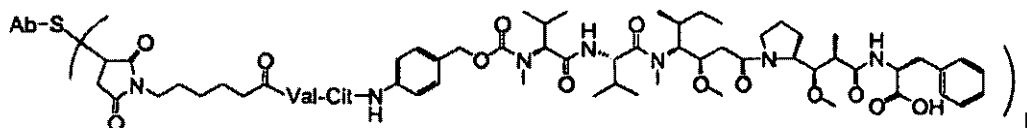
- 10 Un reactivo enlazador dipeptídico de valina-citrulina (val-cit o vc) ilustrativo que tiene un Extensor de maleimida y un Espaciador autoinmolador de paraaminobencilcarbamoilo (PAB) tiene la estructura:



- 15 Un reactivo enlazador de dipéptido phe-lys (Mtr, mono-4-metoxitritilo) ilustrativo que tiene una unidad Extensora de maleimida y una unidad Espaciadora autoinmoladora de PAB puede prepararse de acuerdo con Dubowchik, *et al.* (1997) Tetrahedron Letters. 38: 5257-60, y tiene la estructura:

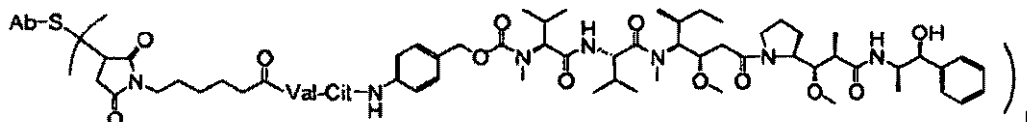


Los compuestos de conjugados de fármaco-anticuerpo ilustrativos incluyen:

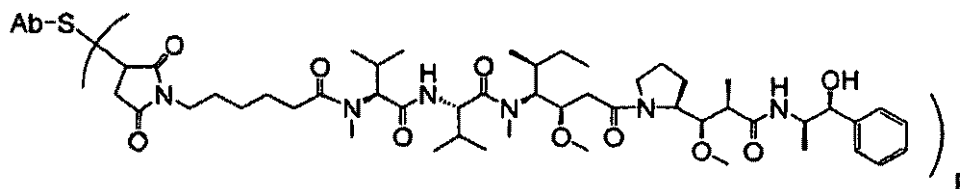


Ab-MC-vc-PAB-MMAF

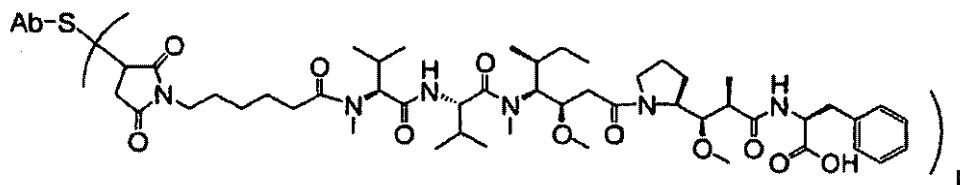
5



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



10 Ab-MC-MMAE



15 Ab-MC-MMAF en los que Val es valina; Cit es citrulina; p es 1, 2, 3 o 4; y Ab es un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína.

Preparación de conjugados de fármaco-anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína

20 El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias rutas, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo de cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo enlazador, para formar intermedio de anticuerpo-enlazador Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico activado D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador, para formar intermedio de fármaco-enlazador D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un grupo de cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Pueden emplearse los métodos de conjugación (1) y (2) con una diversidad de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, restos farmacológicos y enlazadores para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de Fórmula L.

30 Los grupos de tiol de cisteína de anticuerpo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en reactivos enlazadores e intermedios de fármaco-enlazador incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida; y (iv) disulfuros, incluyendo piridil disulfuros, mediante intercambio de sulfuro. Los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, tiroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidracida
35 capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al* (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de reoxidación para reformar los enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios (Ejemplo x). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética con cisteína, de longitud completa,

(TioMab) expresados en células CHO se reducen con aproximadamente un exceso de 50 veces de TCEP durante 3 horas a 37 °C para reducir enlaces disulfuro en aductos de cisteína que pueden formarse entre los restos de cisteína recién introducidos y la cisteína presente en el medio de cultivo. El TioMab reducido se diluye y se carga en una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5 y se eluye con PBS que contiene cloruro sódico 0,3 M. Se reestablecieron enlaces disulfuro entre restos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso diluido (200 nM) a temperatura ambiente, durante una noche. Como alternativa, el ácido deshidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para reestablecer los grupos disulfuro intracatenarios del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína después de escisión reductora de los aductos de cisteína. Pueden usarse otros oxidantes, es decir agentes oxidantes, y condiciones oxidantes, que se conocen en la técnica. También es eficaz la oxidación en aire ambiental. Esta etapa de reoxidación parcial, suave, forma disulfuros intracatenarios eficazmente con alta fidelidad y conserva los grupos tiol de los restos de cisteína recién introducidos. Se añadió un exceso de aproximadamente 10 veces de intermedio de enlazador-fármaco, por ejemplo MC-vc-PAB-MMAE, se mezcló, y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar el conjugado de fármaco-anticuerpo anti CD22 10F4v3. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y eluyó a través de una columna HiTrap S para retirar intermedio de enlazador-fármaco en exceso y otras impurezas.

La Figura 12 muestra el procedimiento general para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína expresado a partir del cultivo celular para conjugación. Cuando el medio de cultivo celular contiene cisteína, pueden formarse aductos de disulfuro entre el aminoácido de cisteína recién introducido y cisteína del medio. Estos aductos de cisteína, representados como un círculo en el TioMab ilustrativo (izquierda) en la Figura 12, deben reducirse para generar anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína reactivos para conjugación. Los aductos de cisteína, supuestamente junto con diversos enlaces disulfuro intercatenarios, se escinden de forma reductora para proporcionar una forma reducida del anticuerpo con agente reductores tales como TCEP. Los enlaces disulfuro intercatenarios entre restos de cisteína emparejados se reforman en condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o exposición a oxígeno ambiental. Los restos de cisteína recién introducidos, añadidos por ingeniería genética y no emparejados permanecen disponibles para reacción con reactivos enlazadores o intermedios de fármaco-enlazador para formar los conjugados de anticuerpo de la invención. Los TioMab expresados en líneas celulares de mamífero dan como resultado aducto de Cys conjugado de forma externa con una Cys introducida por ingeniería genética mediante formación de enlaces-S-S-. Por lo tanto los TioMab purificados se tratan con los procedimientos de reducción y reoxidación como se describen en el Ejemplo x para producir TioMab reactivos. Estos TioMab se usan para conjugar con fármacos citotóxicos que contienen maleimida, fluoróforos y otros marcadores.

Métodos de exploración

También se describe en la presente memoria un método para determinar la presencia de un polipéptido de CD22 en una muestra que se sospecha que contiene el polipéptido de CD22, en el que el método comprende exponer la muestra a un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de fármaco y anticuerpo del mismo, que se une con el polipéptido de CD22 y determinar la unión del anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, o conjugado de fármaco y anticuerpo del mismo, con el polipéptido de CD22 en la muestra, en el que la presencia de dicha unión es indicativa de la presencia del polipéptido de CD22 en la muestra. Opcionalmente la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) que se sospecha que expresan el polipéptido de CD22. El anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de fármaco y anticuerpo del mismo, empleado en el método puede opcionalmente estar marcado de forma detectable, unido a un soporte sólido o similares.

Otro ejemplo es un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero, en el que el método comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende células tisulares obtenidas del mamífero con un anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, o conjugado de fármaco y anticuerpo del mismo, que se une con un polipéptido de CD22 y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, o conjugado de fármaco y anticuerpo del mismo, y el polipéptido de CD22 en la muestra de ensayo, en el que la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína, o conjugado de fármaco y anticuerpo del mismo, está marcado de forma detectable, unido a un soporte sólido, o similares, y/o la muestra de ensayo de células tisulares se obtiene de un individuo que se sospecha que tiene un tumor canceroso.

Metabolitos de los conjugados de anticuerpo-fármaco

También se describen los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de ADC descritos en la presente memoria. Dichos productos pueden resultar por ejemplo de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto administrado. En consecuencia, se describen compuestos producidos por un procedimiento que comprende poner en contacto un compuesto descrito en la presente memoria con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

Normalmente se identifican productos metabólicos preparando un ADC radiomarcado (por ejemplo ^{14}C o ^3H), administrándolo por vía parenteral en una dosis detectable (por ejemplo mayor de aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como rata, ratón, cobaya, mono u hombre, permitiendo un tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (normalmente de aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente puesto que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unir epítomos supervivientes en el metabolito). Las estructuras de los metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo, mediante análisis de EM, CL/EM o RMN. En general, el análisis de metabolito se realiza de la misma manera que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que no se encuentren de otro modo *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para dosificación terapéutica de los compuestos de ADC de la invención.

Formulaciones farmacéuticas

Administración de conjugados de anticuerpo-fármaco, incluyendo conjugados de fármaco y anticuerpo-tio

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), incluyendo los conjugados de fármaco y anticuerpo-tio (TDC), pueden administrarse por cualquier vía apropiada para la afección que se trate. El ADC se administrará normalmente por vía parenteral, es decir infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

Para tratar estos cánceres, en una realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco se administra mediante infusión intravenosa. La dosificación administrada mediante infusión está en el intervalo de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $10.000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ por dosis, generalmente una dosis por semana durante un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Como alternativa, el intervalo de dosificación es de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $800\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $600\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $400\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $500\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $300\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $200\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $200\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, múltiples veces a la semana, pero menos de una vez al día, múltiples veces al mes pero menos de una vez al día, múltiples veces al mes pero menos de una vez por semana, una vez al mes o intermitentemente para disipar o aliviar síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar a cualquiera de los intervalos desvelados hasta la remisión del tumor o los síntomas del linfoma, leucemia que se trate. La administración puede continuar después de conseguirse la remisión o alivio de los síntomas, cuando dicha remisión o alivio se prolonga por dicha administración continuada.

También se describe en la presente memoria un método para aliviar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad autoinmunitaria, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fármaco-anticuerpo 10F4 humanizado como se describe en la presente memoria. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se administra por vía intravenosa o por vía subcutánea. El conjugado de anticuerpo-fármaco se administra por vía intravenosa a una dosificación en el intervalo de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $100\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ por dosis y en una realización específica, la dosificación es de $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $500\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, múltiples veces a la semana, pero menos de una vez al día, múltiples veces al mes pero menos de una vez al día, múltiples veces al mes pero menos de una vez a la semana, una vez al mes o intermitentemente para disipar o aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar a cualquiera de los intervalos desvelados hasta la disipación o alivio de los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria que se trate. La administración puede continuar después de conseguirse la disipación o alivio de los síntomas cuando dicha disipación o alivio se prolonga por dicha administración continuada.

También se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno de linfocitos B que comprende administrar a un paciente que padece un trastorno de linfocitos B, tal como un trastorno proliferativo de linfocitos B (incluyendo pero sin limitación linfoma y leucemia) o una enfermedad autoinmunitaria, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo 10F4 humanizado como se describe en la presente memoria, no estando dicho anticuerpo conjugado con una molécula citotóxica o una molécula detectable. El anticuerpo se administrará normalmente en un intervalo de dosificación de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$.

También se describen en la presente memoria formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti CD22 de la invención y/o al menos un inmunoconjugado del mismo y/o al menos un conjugado de fármaco-anticuerpo anti CD22 de la invención. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti CD22 y/o un conjugado de fármaco-anticuerpo anti CD22 y/o un inmunoconjugado del mismo, y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti CD22 y/o un inmunoconjugado del mismo, y opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional.

Se preparan formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o inmunoconjugado o el conjugado de

anticuerpo-fármaco para almacenamiento mezclando el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de soluciones acuosas o formulaciones liofilizadas u otras secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio); fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas para usar para administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

También pueden atraparse principios activos en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado de la invención, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradable tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilvinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando permanecen en el cuerpo anticuerpos encapsulados o inmunoconjugados durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermodulares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Tratamientos de conjugado de anticuerpo-fármaco

Se contempla que los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) pueden usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo caracterizadas por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Las afecciones o los trastornos hiperproliferativos ilustrativos incluyen tumores benignos o malignos; leucemia y tumores malignos linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma, del blastocelo, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo autoinmunitarios.

Los compuestos de ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos basados en células pueden ensayarse adicionalmente en primates superiores portadores de tumores y ensayos clínicos humanos. Los ensayos clínicos humanos pueden diseñarse para ensayar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti CD22 o inmunoconjugado de la invención en pacientes que experimentan un trastorno proliferativo de linfocitos B incluyendo sin limitación linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto. El ensayo clínico puede diseñarse para evaluar la eficacia de un ADC en combinaciones con regímenes terapéuticos conocidos, tales como radiación y/o quimioterapia que implica agentes quimioterapéuticos y/o citotóxicos conocidos.

Generalmente, la enfermedad o el trastorno para tratar es una enfermedad hiperproliferativa tal como un trastorno proliferativo de linfocitos B y/o un cáncer de linfocitos B. Los ejemplos de cáncer para tratar en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado de linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.

El cáncer puede comprender células que expresan CD22, de modo que el ADC de la invención es capaz de unirse a las células cancerosas. Para determinar la expresión de CD22 en el cáncer, están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, puede analizarse la sobreexpresión de CD22 por IHC. Pueden someterse secciones tisulares incluidas en parafina de una biopsia tumoral al ensayo de IHC y concedérsele un

5 criterio de intensidad de tinción de proteína CD22 con respecto al grado de tinción y en qué proporción de células tumorales examinadas.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad para tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si la molécula

10 se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. La molécula se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para administración a un paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o bien por infusión continua. Una

15 dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación ilustrativa de ADC para administrar a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente.

Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un régimen de dosificación

20 ilustrativa comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti ErbB2. Pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

25 Terapia de combinación

Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) puede combinarse en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tenga propiedades

30 antineoplásicas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación preferentemente tiene actividades complementarias del ADC de la combinación de modo que no se afecten de forma adversa entre sí.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en

35 combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido. Una composición farmacéutica que contenga un ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa o un agente de unión de ADN.

En un aspecto, el primer compuesto es un ADC anti-CD22 de la invención y el segundo compuesto es un anticuerpo anti-CD20 (bien un anticuerpo desnudo o bien un ADC). En una realización el segundo compuesto es un anticuerpo

40 anti-CD20 rituximab (Rituxan®) o 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Otros anticuerpos útiles para inmunoterapia combinada con ADC anti-CD22 de la invención incluye sin limitación, anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®).

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un agente antineoplásico identificado de acuerdo con la presente invención, incluyendo sin limitación radioterapia y/o trasplantes de médula ósea y sangre

45 periférica y/o un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP o productos inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®). La terapia de combinación puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra de forma secuencial, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La

50 administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

En una realización, el tratamiento con un ADC implica la administración combinada de un agente antineoplásico identificado en la presente memoria, y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento,

60 incluyendo coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. Pueden usarse programas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determina de forma empírica por el practicante experto. También se describen programas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia en "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins,

65 Baltimore, Md.

Son dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores las usadas en la presente memoria y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del nuevo agente identificado y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

La terapia de combinación puede proporcionar “sinergia” y demostrarse “sinérgico”, es decir, el efecto conseguido con los principios activos usados junto es mayor que la suma de los efectos que resulta de usar los compuestos por separado. Puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se co-formulan y administran o suministran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria, combinada; (2) se suministran por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia alternante, puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternante, se administra una dosificación eficaz de cada principio activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en terapia de combinación se administran juntas dosificaciones eficaces de dos o más principios activos.

Metabolitos de los conjugados de anticuerpo-fármaco

Los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de ADC descritos en la presente memoria, se desvelan en la presente memoria. Dichos productos pueden resultar de, por ejemplo, la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática y similares, del compuesto administrado. Se desvelan en la presente memoria compuestos producidos por un procedimiento que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

Los productos de metabolitos normalmente se identifican preparando un ADC radiomarcado (por ejemplo ^{14}C o ^3H), administrándolo por vía parenteral en una dosis detectable (por ejemplo, mayor de aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como rata, ratón, cobaya, mono, o ser humano, permitiendo un tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (normalmente de aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente puesto que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unir epítomos supervivientes en el metabolito). Las estructuras de metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo mediante análisis de EM, CL/EM o RMN. En general, el análisis de metabolitos se realiza de la misma manera que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que se no se encuentren de otro modo *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para dosificación terapéutica de los compuestos de ADC de la invención.

Métodos adicionales para usar anticuerpos anti-CD22 e inmunoconjugados

Métodos de diagnóstico y métodos de detección

En un aspecto, los anticuerpos anti-CD22 e inmunoconjugados son útiles para detectar la presencia de CD22 en una muestra biológica. El término “detectar” como se usa en la presente memoria abarca detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido. En ciertas realizaciones, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan CD22 a niveles mayores en relación con otros tejidos, por ejemplo, linfocitos B y/o tejidos asociados con linfocitos B.

En un aspecto, se describe un método para detectar la presencia de CD22 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD22 en condiciones permisivas para unión del anticuerpo anti-CD22 con CD22, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22.

En un aspecto, se describe un método para diagnosticar un trastorno asociado con aumento de la expresión de CD22. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-CD22; determinar el nivel de expresión (cuantitativa o cualitativamente) de CD22 por la célula de ensayo detectando la unión del anticuerpo anti-CD22 con CD22; y comparar el nivel de expresión de CD22 por la célula de ensayo con el nivel de expresión de CD22 por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo o una célula que exprese CD22 a niveles comparables con dicha célula normal), en el que un mayor nivel de expresión de CD22 por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con aumento de la expresión de CD22. En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado con aumento de la expresión de CD22. En ciertas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

Los trastornos proliferativos celulares ilustrativos que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen un trastorno de linfocitos B y/o un trastorno proliferativo de linfocitos B incluyendo, pero sin limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia,

leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.

En ciertas realizaciones, un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-CD22 con CD22 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa CD22 en su superficie. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-CD22 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD22 con CD22, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22 en la superficie celular. Un ensayo ilustrativo para detectar la unión de un anticuerpo anti-CD22 con CD22 expresado en la superficie de una célula es un ensayo de "FACS".

Pueden usarse ciertos otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-CD22 con CD22. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígenos que se conocen bien en la técnica, tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

En ciertas realizaciones, se marcan anticuerpos anti-CD22. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrón-densos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelados de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano rusticano (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En ciertas realizaciones, se inmovilizan anticuerpos anti-CD22 en una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-CD22 de cualquier CD22 que permanezca libre en solución. Esto se consigue convencionalmente insolubilizando el anticuerpo anti-CD22 antes del procedimiento de ensayo, o por adsorción con una superficie o matriz insoluble en agua (Bennich *et al.*, documento U.S. 3.720.760) o por acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído) o insolubilizando el anticuerpo anti-CD22 después de formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

Puede llevarse a cabo cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o detección anteriores usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-CD22.

Métodos terapéuticos

Puede usarse un anticuerpo o inmunoconjugado en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento o proliferación celular, bien *in vivo* o bien *in vitro*, comprendiendo el método exponer una célula a un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado del mismo en condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado con CD22. "Inhibir el crecimiento o proliferación celular" significa reducir el crecimiento o proliferación de una célula en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100% e incluye inducir la muerte celular. En ciertas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En ciertas realizaciones, la célula es un linfocito B. En ciertas realizaciones, la célula es un xenoinjerto, por ejemplo, como se ejemplifica en la presente memoria.

En un aspecto, se usa un anticuerpo o inmunoconjugado para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de linfocitos B. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo celular se asocia con aumento de la expresión y/o actividad de CD22. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de linfocitos B se asocia con aumento de la expresión de CD22 en la superficie de un linfocito B. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de linfocitos B es un tumor o un cáncer. Los ejemplos de trastornos proliferativos de linfocitos B para tratar por los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado del mismo. En ciertas realizaciones, un método para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado anti-CD22 y, opcionalmente, el menos un agente terapéutico adicional, tal como los proporcionados posteriormente. En ciertas realizaciones, un método para tratar un trastorno proliferativo celular

comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende 1) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-CD22 y un agente citotóxico; y opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional, tal como los proporcionados posteriormente.

5 En un aspecto, al menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados pueden unirse con CD22 de una especie distinta de la humana. En consecuencia, pueden usarse anticuerpos o inmunoconjugados para unirse a CD22, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene CD22, en seres humanos, o en otros mamíferos que tienen un CD22 con el que reacciona de forma cruzada un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, mono cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, un anticuerpo anti-CD22 o
10 inmunoconjugado puede usarse para dirigirse a CD22 en linfocitos B poniendo en contacto el anticuerpo o inmunoconjugado con CD22 para formar un complejo de anticuerpo o inmunoconjugado-antígeno de modo que una citotoxina conjugada del inmunoconjugado accede al interior de la célula. En una realización, el CD22 es CD22 humano.

15 En una realización, puede usarse un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado en un método para unir CD22 en un individuo que padece un trastorno asociado con aumento de la expresión y/o actividad de CD22, comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo o inmunoconjugado de modo que se una CD22 en el individuo. En una realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unido se internaliza en el linfocito B que expresa CD22. En una realización, el CD22 es CD22 humano, y el individuo es un individuo humano. Como alternativa, el individuo puede
20 ser un mamífero que exprese CD22 con el que se une un anticuerpo anti-CD22. Además, el individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido CD22, (por ejemplo, por administración de CD22 o por expresión de un transgén que codifica CD22).

Puede administrarse un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado a un ser humano para fines terapéuticos. Además, puede administrarse un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado a un mamífero no humano que exprese CD22 con el que reacciona de forma cruzada el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a este último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos o inmunoconjugados de la invención (por ejemplo, ensayos de dosificaciones y ciclos temporales de administración).
30

Pueden usarse anticuerpos o inmunoconjugados solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, puede coadministrarse un anticuerpo o inmunoconjugado con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicional. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP o productos inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®), en los que la terapia de combinación es útil en el tratamiento de cánceres y/o trastornos de linfocitos B tales como trastornos proliferativos de linfocitos B incluyendo linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.
40

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (cuando se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede suceder antes de, simultáneamente con y/o después de la administración del agente terapéutico/o adyuvante adicional. También pueden usarse anticuerpos o inmunoconjugados en combinación con radioterapia.
45

Puede administrarse un anticuerpo o inmunoconjugado (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicional) por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra de forma adecuada por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo o
50 inmunoconjugado. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Los anticuerpos o inmunoconjugados se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. El anticuerpo o inmunoconjugado se formula opcionalmente, aunque no es necesario, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en la presente memoria, o de aproximadamente 1 a
60 65

99 % de las dosificaciones descritas en la presente memoria o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo o inmunoconjugado (cuando se use solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad para tratar, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado, y el criterio del médico al cargo. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra de forma adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-20 mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjugado puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o bien mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ilustrativa del anticuerpo o inmunoconjugado estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, puede administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo o inmunoconjugado al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguido de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación ilustrativo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Ensayos

Pueden caracterizarse anticuerpos anti-CD22 e inmunoconjugados con respecto a sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-CD22 o inmunoconjugados de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad para inhibir el crecimiento o proliferación celular (por ejemplo, actividad de "destrucción de células"), o la capacidad para inducir muerte celular, incluyendo muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunoconjugados que tengan dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En ciertas realizaciones, se ensaya un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado del mismo con respecto a su capacidad para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vitro*. Se conocen bien en la técnica ensayos para inhibición del crecimiento o proliferación celular. Ciertos ensayos para proliferación celular, ejemplificados por los ensayos de "destrucción celular" descritos en la presente memoria, miden la viabilidad celular. Uno de dichos ensayos es el Ensayo de Viabilidad Celular luminiscente CellTiter-Glo™, que está disponible en el mercado de Promega (Madison, WI). Ese ensayo determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, que es un indicio de células metabólicamente activas. Véase Crouch *et al.* (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88, Patente de Estados Unidos N° 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible de exploración de alto rendimiento automática (HTS). Véase Cree *et al.* (1995) Anticancer Drugs 6: 398-404. El procedimiento de ensayo implica añadir un único reactivo (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a células cultivadas. Esto da como resultado lisis celular y generación de una señal luminiscente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en cultivo. Los datos pueden registrarse por un luminómetro o dispositivo de formación de imágenes de cámara CCD. El resultado de luminiscencia se expresa como unidades de luz relativas (ULR).

Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo de "MTT", un ensayo colorimétrico que mide la oxidación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazan por reductasa mitocondrial. Como el ensayo de CellTiter-Glo™, este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un cultivo celular. Véase, por ejemplo, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65: 55-63 y Zhang *et al.* (2005) Cancer Res. 65: 3877-3882.

En un aspecto, se ensayó un anticuerpo anti-CD22 con respecto a su capacidad para inducir la muerte celular *in vitro*. Se conocen bien en la técnica ensayos para inducción de la muerte celular. En algunas realizaciones, dichos ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de integridad de membrana como se indica por la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore *et al.* (1995) Cytotechnology, 17: 1-11) o 7AAD. En un ensayo de captación de PI ilustrativo, las células se cultivan en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM): F-12 de

Ham (50: 50) complementado con FBS inactivado por calor 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. Por lo tanto, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias. Las células se siembran a una densidad de 3×10^6 por placa en placas de 100 x 20 mm y se permite que se unan durante una noche. El medio se retira y se reemplaza con medio nuevo solamente o medio que contiene diversas concentraciones del anticuerpo o inmuoconjugado. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Después del tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Las células se centrifugan después a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de unión de Ca^{2+} frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl_2 2,5 mM) y se separa en alícuotas en tubos de 12 x 75 mm tapados con un filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la retirada de agregados celulares. Los tubos reciben después PI (10 µg/ml). Las muestras se analizan usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software CellQuest FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). Se identifican de este modo anticuerpos o inmuoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular como se determina por captación de PI.

En un aspecto, se ensaya un anticuerpo anti-CD22 o inmuoconjugado con respecto a su capacidad para inducir apoptosis (muerte celular programada) *in vitro*. Un ensayo ilustrativo para anticuerpos o inmuoconjugado que inducen apoptosis es un ensayo de unión de anexina. En un ensayo de unión de anexina ilustrativo, las células se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo anterior. El medio se retira y reemplaza con medio nuevo solamente o medio que contiene de 0,001 a 10 µg/ml del anticuerpo o inmuoconjugado. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Después se centrifugan las células, se resuspenden en tampón de unión de Ca^{2+} y se separan en alícuotas en tubos como se ha analizado en el párrafo anterior. Los tubos reciben después anexina marcada (por ejemplo anexina V-FITC) (1 µg/ml). Las muestras se analizan usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software CellQuest FACSCONVERT™ (BD Biosciences). Se identifican de este modo anticuerpos o inmuoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina en relación con el control. Otro ensayo ilustrativo para anticuerpos o inmuoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico de ELISA de ADN de histonas para detectar degradación internucleosómica de ADN genómico. Dicho ensayo puede realizarse usando, por ejemplo, el kit de ELISA de Detección de Muerte Celular (Roche, Palo Alto, CA).

Las células para uso en cualquiera de los ensayos *in vitro* anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan de forma natural CD22 o que se han modificado por ingeniería genética para expresar CD22. Dichas células incluyen células tumorales que sobreexpresan CD22 en relación con células normales del mismo origen tisular. Dichas células también incluyen líneas celulares (incluyendo líneas celulares tumorales) que expresan CD22 y líneas celulares que no expresan normalmente CD22 pero se han transfectado con ácido nucleico que codifica CD22.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 o inmuoconjugado del mismo se ensaya con respecto a su capacidad para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vivo*. En ciertas realizaciones, se ensaya un anticuerpo anti-CD22 o inmuoconjugado del mismo con respecto a su capacidad para inhibir su crecimiento tumoral *in vivo*. Pueden usarse sistemas de modelos *in vivo*, tales como modelos de xenoinjerto, para dichos ensayos. En un sistema de xenoinjerto ilustrativo, se introducen células tumorales humanas en un animal no humano inmunocomprometido de forma adecuada, por ejemplo, un ratón SCID. Se administra al animal un anticuerpo o inmuoconjugado de la invención. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmuoconjugado para inhibir o reducir el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones del sistema de xenoinjertos anterior, las células tumorales humanas son células tumorales de un paciente humano. Dichas células útiles para preparar modelos de xenoinjerto incluyen líneas celulares de linfoma y leucemia humanas, que incluyen sin limitación las células BJAB-luc (una línea celular de linfoma de Burkitt negativo para EBV transfectada con el gen indicador de luciferasa), células de Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), células de Raji (ATCC, Manassas, VA, CCL-86), células SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Alemania, AAC 495), células DoHH2 (véase Kluin-Neilemans, H.C. *et al.*, Leukemia 5: 221-224 (1991), y Kluin-Neilemans, H.C. *et al.*, Leukemia 8: 1385-1391 (1994)), células Granta-519 (véase Jadayel, D.M. *et al.*, Leukemia 11(1): 64-72 (1997)). En ciertas realizaciones, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano inmunocomprometido de forma adecuada por inyección subcutánea o por trasplante en un sitio adecuado, tal como una almohadilla adiposa mamaria.

Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, se ensayó un anticuerpo anti-CD22 con respecto a su actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se ensayó un anticuerpo anti-CD22 con respecto a su capacidad para unirse con CD22 expresado en la superficie de una célula. Puede usarse un ensayo de FACS para dichos ensayos.

En un aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo 10F4.4.1 murino, el anticuerpo 10F4v1 humanizado, el anticuerpo 10F4v3 y/o el anticuerpo 5E8.1.8 murino por la unión con CD22. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo de competición se une con el mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que se une con el anticuerpo 10F4.4.1 murino, el anticuerpo 10F4v1 humanizado, el anticuerpo 10F4v3 y/o el anticuerpo 5E8.1.8 murino. Los ensayos de competición ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ensayos rutinarios tales como los proporcionados en Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual c.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Se proporcionan

métodos ilustrativos detallados para mapear un epítipo con el que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen con el mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en 50 % o más.

- 5 En un ensayo de competición ilustrativo, se incubaba CD22 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une con CD22 (por ejemplo, anticuerpo 10F4.4.1 murino, anticuerpo 10F4v1 humanizado, anticuerpo 10F4v3 humanizado y/o anticuerpo 5EB.1.8 murino) y un segundo anticuerpo no marcado que se ensaya con respecto a su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión con CD22. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba CD22 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo con CD22, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con CD22 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con CD22 inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión con CD22. En ciertas realizaciones, CD22 inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa CD22 en su superficie.

- En un aspecto, los anticuerpos anti-CD22 purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

- También se describe en la presente memoria un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo hace un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades Fc del anticuerpo se miden para asegurar que se mantienen solamente las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión con el receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión con FcγR (careciendo por lo tanto probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión con FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica.

Ejemplos

- Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo monoclonal murino anti-CD22 humano

- Se prepararon anticuerpos monoclonales murinos capaces de unirse específicamente con CD22 humano. Se inmunizaron ratones hembra BALB/c, de seis semanas de edad, en sus almohadillas plantares con dominio extracelular marcado con his-8 de CD22 humano purificado que carece de los dominios 3 y 4 (SEC ID N°: 30 (ECD) más la secuencia GRAHHHHHHHHH en el extremo C terminal) o dominio extracelular marcado con his-8 de CD22 que comprende los dominios 1-7 (SEC ID N°: 28 (ECD) más el marcador de secuencia His anterior) en adyuvante de Ribí. Se realizaron inyecciones posteriores de la misma manera a una y tres semanas después de las inmunizaciones iniciales. Tres días después de la inyección final, se retiraron y agruparon los ganglios linfáticos inguinales y popliteales, y se realizó una única suspensión celular pasando el tejido a través de gasa de acero. Las células se fusionaron a una relación de 4:1 con mieloma de ratón tal como P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) en (DMEM) de alta glucosa que contenía polietilenglicol 4000 50 % p/v. Las células fusionadas se sembraron después a una densidad de 2×10^5 por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Después de 24 horas se añadió medio selectivo de HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina, Sigma, N° H0262). Quince días después de la fusión, se ensayaron los sobrenadantes de células crecientes con respecto a la presencia de anticuerpos específicos para CD22 humano usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD22 humano 10F4.4.1 (mu 10F4) y 5E8.1.8 (mu 5E8) se seleccionaron para estudio adicional basándose en ensayos basados en células y ensayos de placas que mostraron que los anticuerpos se unían específicamente con CD22 humano. Los ensayos se describen en los siguientes párrafos.

5 Ensayos basados en ELISA: Se realiza exploración de anticuerpo anti-CD22 por ELISA como sigue, con todas las incubaciones realizadas a temperatura ambiente. Se recubrieron placas de ensayo (Inmunoplaaca Nunc) durante 2 horas con CD22 purificado en tampón de carbonato sódico 50 mM, pH 9,6, después se bloquearon con albúmina de suero bovino 0,5 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos, después se lavaron cuatro veces con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (PBST). Se añaden sobrenadantes de anticuerpo de ensayo y se
10 incuban durante dos horas con agitación, después se lavan cuatro veces con PBST. Las placas se desarrollan añadiendo 100 µl/pocillo de una solución que contienen 10 mg de diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma, N° P8287) y 10 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % en 25 ml de tampón de citrato de fosfato, pH 5,0 e incubando durante 15 minutos. La reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Los datos se obtienen leyendo las placas en un lector de placas de ELISA automático a una absorbancia de 490 nm.

15 Ejemplo 2: Ensayos basados en FACS para análisis de anticuerpos monoclonales anti-CD22 humano (MAb)

Se incubaron células CHO que expresaban CD22 humano en su superficie con sobrenadante de hibridoma anti-CD22 en 100 µl de tampón de FACS (BSA 0,1 %, azida sódica 10 mM en PBS, pH 7,4) durante 30 minutos a 4 °C
20 seguido de un lavado con tampón de FACS. La cantidad de unión anti-CD22 se determinó incubando una alícuota de la mezcla de anticuerpo/célula con un IgG anti-ratón de cabra o conejo conjugado con FITC policlonal (Accurate Chem. Co., Westbury, NY) (para anticuerpos de ensayo murinos) o IgG anti-humano de cabra o conejo (para anticuerpos humanizados) durante 30 minutos a 4 °C seguido de tres lavados con tampón de FACS.

25 Ejemplo 3: Preparación de anticuerpos anti-CD22 humanizados

Se generaron anticuerpos 10F4 humanizados en los que los restos de aminoácidos de la región hipervariable (HVR) (denominados de forma intercambiable regiones determinantes de complementariedad o CDR) se modificaron mediante mutagénesis dirigida (Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. (1987), 154: 367-382) para llegar a dos variantes,
30 10F4v1 humanizada y 10F4v2 humanizada (también denominados en la presente memoria "10F4v1", "hu10F4v1", "10F4v2", o "hu10F4v2", respectivamente). Una tercera versión, 10F4v3 humanizado ("10F4v3" o "hu10Fv3"), usado en algunos estudios desvelados en la presente memoria tiene las mismas secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada para la proteína madura que hu10F4v2, pero comprende una secuencia señal diferente en el vector usado para expresión proteica.

35 La humanización del anticuerpo 10F4 murino se realizó como se ha desvelado en la presente memoria. Brevemente, las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada de 10F4 murino se clonaron en secuencias marco conservadas consenso modificadas para generar las secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena ligera y pesada mostradas en las Figuras 2A y 2B. Se muestran secuencias marco conservadas de cadena ligera y pesada alternativas que pueden usarse como secuencias marco conservadas de anticuerpos de la invención en las
40 figuras 3 y 4.

Se usó un fagémido de vector de presentación Fab-g3 monovalente (pV0350-2B) que tenía dos fases abiertas de lectura bajo el control del promotor *phoA*, esencialmente como se describe en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340: 1073-93
45 (2004), en la humanización del anticuerpo 10F4. La primera fase abierta de lectura comprendía la secuencia señal STII termoestable de *E. coli* para secreción proteica fusionada con los dominios VL y CH1 de la secuencia de cadena ligera aceptora. La segunda fase abierta de lectura comprendía la secuencia señal STII fusionada con los dominios VH y CH1 de la secuencia de cadena pesada aceptora seguida de una proteína de cubierta de fago menor truncada P3.

50 Los dominios VH y VL de 10F4 murino (SEC ID N°: 89 y 90, respectivamente) se alinearon con el dominio VH consenso de subgrupo III humano (huIII) (SEC ID N°: 24) y dominio kappal consenso humano (huK1) (SEC ID N°: 25), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables (HVR, denominadas de forma intercambiable en la presente memoria regiones determinantes de complementariedad (CDR)) del MAb murino anti-CD22 humano 10F4 se insertaron en secuencias marco conservadas consenso como sigue. Las HVR de cadena
55 ligera (HVR-L1 (posiciones de Kabat 24-34), HVR-L2 (posiciones de Kabat 50-56) y HVR-L3 (posiciones de Kabat 89-97)) del anticuerpo mu 10F4 se introdujeron por ingeniería genética en un marco conservado de anticuerpo de secuencia consenso kappa I humano (huKI) para producir la cadena ligera de 10F4v1 humanizado (SEC ID N°: 17, Fig. 2B). Las HVR de cadena pesada (HVR-H1 (posiciones de Kabat 26-35), HVR-H2 (posiciones de Kabat 49-65) y
60 HVR-H3 (posiciones de Kabat 95-102) del anticuerpo mu 10F4 se introdujeron por ingeniería genética en un dominio VH consenso de subgrupo III humano modificado (humIII) que difiere de la secuencia de huIII en tres posiciones: se usaron R71A, N73T y L78A (véase Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992)) para producir la región variable de cadena pesada de 10F4v1 humanizado (SEC ID N°: 16, Fig. 2A). Se realizó la ingeniería genética de las HVR en los marcos conservados aceptores por mutagénesis de Kunkel usando un oligonucleótido separado
65 para cada región hipervariable. La secuencia de cada clon se determinó por técnicas de secuenciación de ADN convencionales. Las regiones hipervariables y regiones marco conservadas mostradas en las Figuras 2A y 2B se

numeran de acuerdo con la numeración de Kabat (Kabat *et al.* (1991), mencionado anteriormente). Las cadenas ligeras y pesadas se secuenciaron y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables (incluyendo HVR y regiones marco conservadas (FR)) del huK1, el huM1, 10F4 murino, 10F4v1 humanizado y 10F4v2 humanizado se muestran en las Figuras 2A y 2B. El anticuerpo 10F4v3 humanizado tiene la secuencia de aminoácidos idéntica a 10F4v2.

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio VL o dominio VH por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante preparada previamente o una versión no variante del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio VL o dominio VH. Por ejemplo, pueden crearse bibliotecas dirigiéndose a posiciones de aminoácidos accesibles a VL en VH, y opcionalmente en una o más CDR, para sustitución de aminoácidos con aminoácidos variantes usando el método de Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. (1987), 154: 367-382 y los ejemplos de la presente memoria. También se describen posteriormente en los ejemplos la generación de secuencias aleatorias.

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para una posición particular en una región CDR (HVR) o FR de un polipéptido de la invención. Un conjunto de codones es un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes usados para codificar aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codones pueden representarse usando símbolos para designar nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra a continuación con el código IUB.

CÓDIGOS IUB

G Guanina
A Adenina
T Timina
C Citosina
R (A o G)
Y (C o T)
M (A o C)
K (G o T)
S (C o G)
W (A o T)
H (A o C o T)
B (C o G o T)
V (A o C o G)
D (A o G o T)
N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

Pueden sintetizarse conjuntos de oligonucleótidos o cebadores usando métodos convencionales. Puede sintetizarse un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, por síntesis de fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Se conoce bien en la técnica la síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones. Dichos conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tiene un conjunto de codones particular, normalmente incluirá una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia global. Los oligonucleótidos, como se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

En un método, pueden crearse secuencias de ácido nucleico que codifiquen aminoácidos variantes por mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica se conoce bien en este campo como se describe por Zoller *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 10: 6487-6504. Brevemente, se crean secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes hibridando un conjunto de oligonucleótidos que codifican los conjuntos de codones deseados con un molde de ADN, en el que el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia molde de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, se usa ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa del molde que se incorporará de este modo al cebador oligonucleotídico y contendrá los conjuntos de codones como se proporcionan por el conjunto de oligonucleótidos.

Generalmente, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios del molde en cada lado del nucleótido o nucleótidos que codifican la mutación o las mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido hibridará de forma apropiada con la molécula de molde de ADN monocatenaria. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en este campo tales como la descrita por Crea *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75: 5765 (1978).

El molde de ADN se genera por los vectores que derivan de vectores M13 de bacteriófagos (son adecuados los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles en el mercado), o los vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe por Viera *et al.*, Meth. Enzymol., 153: 3 (1987). Por lo tanto, el ADN que debe mutarse puede insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. Se describe la producción del molde monocatenario en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario en condiciones de hibridación adecuadas. Después se añade una enzima de polimerización de ADN, habitualmente ADN polimerasa T7 o el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, para sintetizar la cadena complementaria del molde usando el oligonucleótido como un cebador para la síntesis. Se forma de este modo una molécula de heterodúplex de modo que una cadena de ADN codifique la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (el molde original) codifique la secuencia nativa, inalterada del gen 1. Esta molécula de heterodúplex se transforma después en una célula hospedadora adecuada, habitualmente un procariota tal como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, estas se siembran en placas de agarosa y se exploran usando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con un 32-Fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

El método descrito inmediatamente antes puede modificarse de modo que se cree una molécula de homodúplex en la que ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o las mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), con una tiodesoxirribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo de molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, lo que sirve para protegerla de la digestión con endonucleasas de restricción. Después de cortarse la cadena molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la cadena molde puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada después de la región que contiene el sitio o los sitios para mutar. La reacción se detiene después para dejar una molécula que es solo parcialmente monocatenaria. Después se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula de homodúplex puede después transformarse en una célula hospedadora adecuada.

Como se ha indicado previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de suficiente longitud para hibridar con el ácido nucleico molde y también puede, pero no es necesario, contener sitios de restricción. El molde de ADN puede generarse por los vectores que derivan de vectores de bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.* ((1987) Meth. Enzymol., 153: 3). Por lo tanto, el ADN que va a mutarse debe insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. Se describe la producción del molde monocatenario en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

De acuerdo con otro método, puede generarse una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codones proporcionados dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, junto con una secuencia de ácido nucleico molde de dominio variable, pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden denominarse "casetes de ácido nucleico", ya que puede fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de cubierta viral y dominios de dimerización, usando técnicas de biología molecular establecidas.

Pueden usarse conjuntos de oligonucleótidos en una reacción en cadena de la polimerasa usando una secuencia molde de ácido nucleico de dominio variable como el molde para crear casetes de ácido nucleico. La secuencia molde de ácido nucleico de dominio variable puede ser cualquier parte de las cadenas de inmunoglobulina pesadas que contienen las secuencias de ácido nucleico diana (es decir, secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos diana para sustitución). La secuencia molde de ácido nucleico de región variable es una parte de una molécula de ADN bicatenaria que tiene una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico complementaria. La secuencia molde de ácido nucleico de dominio variable contiene al menos una parte de un dominio variable y tiene al menos una CDR. En algunos casos, la secuencia molde de ácido nucleico de dominio variable contiene más de una CDR. Una parte cadena arriba y una parte cadena abajo de la secuencia molde de ácido nucleico de dominio variable puede ser diana de hibridación con miembros de un conjunto de oligonucleótidos cadena arriba y un conjunto de oligonucleótidos cadena abajo.

Un primer oligonucleótido del conjunto de cebadores cadena arriba puede hibridar con la primera cadena de ácido nucleico y un segundo oligonucleótido del conjunto de cebadores cadena abajo puede hibridar con la segunda cadena de ácido nucleico. Los cebadores de oligonucleótidos pueden incluir uno o más conjuntos de codones y diseñarse para hibridar con una parte de la secuencia molde de ácido nucleico de región variable. El uso de estos oligonucleótidos puede introducir dos o más conjuntos de codones en el producto de PCR (es decir, el casete de ácido nucleico) después de PCR. El cebador oligonucleotídico que hibrida con regiones de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de anticuerpo incluye partes que codifican restos de CDR que son dianas de sustitución de aminoácidos.

Los conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo pueden también sintetizarse para incluir sitios de restricción dentro de la secuencia oligonucleotídica. Estos sitios de restricción pueden facilitar la inserción de los casetes de ácido nucleico (es decir, productos de reacción de PCR) en un vector de expresión que tenga una secuencia de anticuerpo adicional. En una realización, los sitios de restricción se diseñan para facilitar la clonación de los casetes de ácido nucleico sin introducir secuencias de ácido nucleico ajenas o retirar secuencias de ácido nucleico de CDR o marco conservadas originales.

Los casetes de ácido nucleico pueden clonarse en cualquier vector adecuado para expresión de una parte de o la secuencia de cadena ligera o pesada completa que contiene las sustituciones de aminoácidos diana generadas mediante la reacción de PCR. De acuerdo con los métodos detallados en la invención, el casete de ácido nucleico se clona en un vector permitiendo la producción de una parte de o la secuencia de cadena ligera o pesada completa fusionada con toda o una parte de una proteína de cubierta viral (es decir, creando una proteína de fusión) y se presenta en la superficie de una partícula o célula. Aunque están disponibles varios tipos de vectores y pueden usarse para practicar la presente invención, los vectores fagémidos son los vectores preferidos para su uso en la presente memoria, ya que pueden construirse con relativa facilidad, y pueden amplificarse fácilmente. Los vectores fagémidos generalmente contienen una diversidad de componentes incluyendo promotores, secuencias señal, genes de selección fenotípica, sitios de origen de replicación, y otros componentes necesarios como se conocen por los expertos habituales en la materia.

Cuando debe expresarse una combinación de aminoácidos variante particular, el casete de ácido nucleico contiene una secuencia que es capaz de codificar todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o ligera, y es capaz de codificar las combinaciones de aminoácidos variantes. Para la producción de anticuerpos que contienen estos aminoácidos variantes o combinaciones de aminoácidos variantes, como en una biblioteca, los casetes de ácido nucleico pueden insertarse en un vector de expresión que contiene una secuencia de anticuerpo adicional, por ejemplo todos o partes de los dominios constantes o variables de las regiones variables de cadena ligera y pesada. Estas secuencias de anticuerpo adicionales también pueden fusionarse con otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como secuencias que codifican proteínas de la cubierta viral y de este modo permiten la producción de una proteína de fusión.

Ejemplo 4: Determinación de secuencia de región variable

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de los anticuerpos monoclonales 10F4 murinos y humanizados se determinaron por procedimientos convencionales. Se extrajo ARN total de células de hibridoma produciendo los anticuerpos monoclonales 10F4.4.1 anti-CD22 humano de ratón usando el Mini Kit RNeasy® (Qiagen, Alemania). Los dominios variable ligero (VL) y variable pesado (VH) se amplificaron usando RT-PCR con cebadores degenerados. Los cebadores directos fueron específicos para las secuencias de aminoácidos N-terminales de las regiones VL y VH del anticuerpo. Respectivamente, los cebadores inversos de cadena ligera y cadena pesada se diseñaron para hibridar con una región en el dominio ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1), que está altamente conservado entre especies. Se clonaron VH y VL amplificados en un vector de expresión de células de mamífero pRK (Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276:659-04 (2000)). La secuencia polinucleotídica de los insertos se determinó usando métodos de secuenciación rutinarios. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada de 10F4 quimérico murino y 10F4v1 humanizado y 10F4v2 humanizado se muestran en las Figuras 2A y 2B.

10F4v1 humanizado se modificó adicionalmente en la posición de HVR-L1 28 (N28) (SEC ID N°: 9). (Véase Figura 2B). El resto de asparagina en esa posición se reemplazó con un resto de valina (N28V) para generar HVR-L1 (SEC ID N°: 10) para las variantes de hu10F4v2 y hu10F4v3, que mostraron afinidad de unión mejorada. Estas variantes comprenden las mismas secuencias de dominio variable y constante del anticuerpo maduro y difieren solamente en una secuencia señal no hallada en el anticuerpo maduro de la invención.

Se generaron modificaciones de secuencia de aminoácidos adicionales en uno o ambos de los aminoácidos Asn28 (N28) y/o Asn30 (N30) de la región hipervariable HVR-L1 (véase Figura 2B) de hu10F4v1. Debido a que N28 y N30 son posibles sitios para desaminación, se ensayaron cambios de aminoácidos en estos sitios. Por ejemplo, se reemplazó asparagina en la posición 28 (N28) alternativamente con A, Q, S, D, V o I, y asparagina en la posición 30 (N30) se reemplazó alternativamente con A o Q. Se proporcionan cambios de secuencia de aminoácidos en el dominio HVR-L1 de acuerdo con la invención en la Tabla 2 junto con sus afinidades de unión como se ensaya por análisis de competición en un ensayo de ELISA de fagos (CI50) usando procedimientos convencionales.

Tabla 2

Variantes de sustitución de anticuerpo hu 10F4v1		
Cambio de aminoácidos en HVR-L1 Figura 2B	HVR-L1 SEC ID N°	Afinidad de unión (nM)
Sin cambios (N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7,3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7,3
N28I, N30	23	9,8
N28, N30A	32	7,7
N28, N30Q	33	10

Para la generación de versiones de IgG1 humana de longitud completa del anticuerpo 10F4 humanizado, las cadenas pesada y ligera se subclonan por separado en plásmidos pRK previamente descritos (Gorman, CM *et al.* (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2: 3). Se cotransfectan plásmidos de cadena pesada y ligera apropiados (dependiendo del cambio o los cambios de secuencia deseados) en una línea celular de riñón embrionario humano transformado con adenovirus, conocida como 293 (Graham, FL *et al.* (1977), J. Gen. Virol. 36: 59), usando un procedimiento de alta eficacia (Graham *et al.*, mencionado anteriormente y Gorman, CM, Science 221: 551). Los medios se cambian a sin suero y se recogen diariamente durante hasta 5 días. Los anticuerpos se purifican de los sobrenadantes agrupados usando proteína A-Sepharose CL-4B (Pharmacia). El anticuerpo eluido se cambia de tampón a PBS por filtración en gel G25, se concentra por ultrafiltración usando un Centrprep-30 o Centricon-100 (Millipore) y se almacena a 4 °C. La concentración de anticuerpo se determina usando ELISA de unión de IgG total.

Se representan dominios constantes de IgG1 de cadena pesada ilustrativos de acuerdo con la invención en la Figura 5A. Un dominio constante κ de cadena ligera humana ilustrativo comprende, por ejemplo, RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHVDYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 37). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de h10F4v2 se muestra en la Figura 5B en la que las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada se indican por subrayado. Los anticuerpos h10F4v1, v2 y v3 son de isotipo IgG1.

Caracterización de anticuerpos anti-CD22

Ejemplo 5: mapeo de epítomos:

Los epítomos de CD22 con los que se unieron los anticuerpos 10F4.4.1 y 5E8.1.8 se determinaron de acuerdo con los siguientes procedimientos. Se clonaron secuencias de CD22 que carecían de varios de los siete dominios de tipo inmunoglobulina de la isoforma de CD22 principal (CD22beta) y se transformaron en células para expresión estable. Por ejemplo, se clonaron variantes de CD22 que carecía de dominio 1 ($\Delta 1$), dominio 2 ($\Delta 2$) o dominios 3 y 4 ($\Delta 3, 4$), se transformaron en células CHO, y se expresaron en las células. Las células de control expresaban CD22beta. Se realizaron delecciones usando el kit de reactivo Stratagene QuikChange XL™. Se realizó delección del dominio 1 por delección de los aminoácidos 22-138; se realizó delección del dominio 2 por delección de los aminoácidos 139-242; y los dominios 3 y 4 suprimidos estuvieron disponibles como la isoforma menor CD22alfa (delección de los aminoácidos 241-417). Todos los números de aminoácidos se refieren a la numeración del precursor de longitud completa CD22beta por Wilson, GL *et al.* (Véase Figura 1 en Wilson, G.L. *et al.*, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)). La Figura 14 es un diagrama de los dominios suprimidos. La unión se determinó por citometría de flujo usando un control de isotipo. La unión de 10F4.4.1 se detectó usando IgG de cabra anti-ratón Alexa 488. Se detectó la unión de 5E8.1.8 usando IgG de cabra anti-ratón biotinilado más estreptavidina PE. Un efecto adverso en la unión de anticuerpos los 10F4.4.1 murino o 5E8.1.8 murino en ausencia de dominios ECD particulares indicó que el anticuerpo se unía a esos dominios. 10F4.4.1 y 5E8.1.8 murinos mostraron las mismas características de unión en estas condiciones. Ninguno se unió a CD22 sin el dominio 1 o dominio 2, y ambos se unieron a CD22 que comprendía los dominios 1 y 2, pero carecía de los dominios 3 y 4. Usando este método, se determinó que 10F4.4.1 y 5E8.1.8 se unían a los dominios 1 y 2 de CD22 humano, dentro de la secuencia del aminoácido 22 al aminoácido 240 de SEC ID N°: 27 (véase Wilson, G.L. *et al.*, (1991) mencionado anteriormente).

Ejemplo 6: Caracterización de la afinidad de unión con antígeno soluble

La afinidad de unión del anticuerpo 10F4 murino y humanizado por el dominio extracelular (ECD) de CD22 soluble se determinó por medición de resonancia de plasmón superficial usando un sistema BIACORE® 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Brevemente, se activaron microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, Biacore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Estas microplacas activadas se recubrieron con anticuerpo IgG1 anti-CD22 10F4 (murino o humanizado) por dilución a 5 µg/ml con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, antes de la inyección a un

caudal de 5 μ l/minuto para conseguir aproximadamente 500 unidades de respuesta (UR) de anticuerpo acoplado. A continuación, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear grupos que no habían reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de aproximadamente dos veces de antígeno soluble marcado con His-ECD-CD22-beta humano (aproximadamente 500 nM a aproximadamente 7,8 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % a 25 °C a un caudal de 30 μ l/minuto. Se calcularon las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (Software BIAevaluation versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} . El anticuerpo anti-CD22, RFB4, se usó como un control (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, catálogo N° CBL147). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2
Afinidad de unión de anti-CD22 por CD22 humano soluble (análisis de BIAcore®)

Clon	$K_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	K_d (nM)
10F4 Murino	0,19	2,8	15
10F4 Quimérico	0,26	4,2	16
10F4v1 Humanizado	0,18	3,5	19
10F4v2 Humanizado	0,32	2,5	7,8
RFB4 de control	0,33	1,4	4,2

Ejemplo 7: Caracterización de la afinidad de unión con el antígeno de superficie celular

La afinidad de unión de 10F4.4.1 murino y 10F4v1 y 10F4v2 humanizado por CD22 humano y de mono cynomolgus (cyno) expresado en la superficie de células CHO se examinó usando un ensayo de competición. Brevemente, las células CHO expresaban de forma estable CD22 humano de longitud completa (SEC ID N°: 27) o CD22 de mono cynomolgus (cyno) (SEC ID N°: 31). El anticuerpo anti-CD22 (10F4v1 o V2 murino o humanizado) estaba yodado con reactivo Iodogen® [125 I] a una actividad específica de aproximadamente 10 μ Ci/ μ g. Se realizó un ensayo de unión competitiva, basado en células, usando anticuerpo anti-CD22 no marcado, diluido en serie. Se permitió que los anticuerpos se unieran a las células durante 4 horas a 4 °C. La afinidad de unión, K_D , de los anticuerpos se determinó de acuerdo con el análisis de Scatchard convencional realizado utilizando un programa de ajuste de curva no lineal (véase, por ejemplo, Munson *et al.*, Anal Biochem, 107: 220-239, 1980). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3 a continuación.

TABLA 3
Afinidad de unión de MAb 10F4 por CD22 humano y Cyno
Anticuerpo K_d de CD22 humano (nM) K_d de CD22 de Cyno (nM)

Mu 10F4.4.1	2,4	2,3
Hu 10F4v1*	1,1, 1,7	1,4, 1,8
Hu 10F4v2	1,6	2,1

* Ensayos repetidos

Los resultados indican que 10F4 murino y humanizado se une a CD22 humano y de cyno expresado en la superficie de células CHO con afinidad aproximadamente equivalente.

Ejemplo 8: Producción de conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD22

Se produjeron ADC anti-CD22 conjugando anticuerpos anti-CD22 RFB4, 5E8 murino, 10F4 murino, 10F4v1 humanizado, TioMab 10F4v1 humanizado (tio-10F4v1), 10F4v2 humanizado y 10F4v3 humanizado con los siguientes restos de enlazador-fármaco: spp-DM1, smcc-DM1-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE y MC-MMAF, cuyos restos farmacológicos y enlazadores se desvelan en la presente memoria así como en el documento WO 2004/010957, publicado el 5 de febrero de 2004 y el documento WO2006/034488, publicado el 9 de septiembre de 2005. Antes de la conjugación, los anticuerpos se redujeron parcialmente con TCEP usando métodos convencionales de acuerdo con la metodología descrita en el documento WO 2004/010957. Los anticuerpos reducidos parcialmente se conjugaron con los restos de enlazador-fármaco anteriores usando métodos convencionales de acuerdo con la metodología descrita en Doronina *et al.* (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 y documento US 2005/0238649 A1. Brevemente, los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con los restos de enlazador-fármaco para permitir la conjugación de los restos con restos de cisteína. Las reacciones de conjugación se interrumpieron, y los ADC se purificaron. La carga farmacológica (número medio de restos farmacológicos por anticuerpo) para cada ADC se determinó por HPLC. Otros enlazadores útiles para la preparación de ADC incluyen, sin limitación, BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) e incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃ y BM(PEO)₄.

También se producen ADC anti-CD22 por conjugación con restos de lisina del anticuerpo. Se convierten lisinas del anticuerpo en grupos sulfhidrilo usando, por ejemplo, reactivo de Traut (Pierce Chemical Co.) como se desvela en la presente memoria. Los grupos de sulfhidrilo resultantes son reactivos con enlazadores o moléculas farmacológicas de enlazadores para la preparación de ADC. Como alternativa, se producen ADC haciendo reaccionar una lisina en un anticuerpo anti-CD22 con el enlazador, SPP (*N*-succinimidil 4-(2'-piridilditio) pentanoato), que puede estar ya unido con una molécula farmacológica o puede hacerse reaccionar posteriormente con una molécula farmacológica, tal como un maitansinoide. Por ejemplo, un anticuerpo se modifica por reacción con SPP, seguido de conjugación con f como se desvela en Wang, L. *et al.*, Protein Science 14:2436-2446 (2005), cuya referencia se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. También pueden hacerse reaccionar restos de lisina en un anticuerpo anti-CD22 con el enlazador, SMCC (Pierce Chemical Co.) a pH 7-9 de modo que la *N*-hidroxisuccinimida sensible a amina (éster de NHS) de SMCC forma un enlace de amida estable con el anticuerpo. El grupo de maleimida sensible a sulfhidrilo de SMCC se hace reaccionar con el grupo de sulfhidrilo de DM1 a pH 6,5-7,5 (véase Pierce Chemical Co., piercenet.com) para formar el ADC. Se hacen reaccionar restos de lisina o cisteína con enlazador-fármaco para producir ADC que comprenden una carga farmacológica media de aproximadamente 1-8 moléculas farmacológicas enlazadoras por anticuerpo, como alternativa, 1-6, 1-4, 1-3 o 1-2 moléculas farmacológicas enlazadoras por anticuerpo.

Se prepararon ADC anti-CD22 (RFB4)-SMCC-DM1 y anti-GP120-SMCC-DM1 de acuerdo con este método, en el que se preparó RFB4-smcc-DM1 a cargas farmacológicas bajas (1,95), medias (3,7) y altas (6,75). Se preparó anti-GP120-smcc-DM1 a carga farmacológica alta (6,1). Se mostró que estos ADC son eficaces *in vivo*, como se muestra en el Ejemplo 9 y en la Tabla 9, a continuación en la presente memoria.

Ejemplo 9: Eficacia de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD22

Estudios *in vitro* de determinantes de eficacia.

Se determinaron los determinantes de eficacia de ADC (o TDC) anti-CD22 en una línea celular de linfoma. Se sabe que CD22 expresado en la superficie de linfocitos B se internaliza tras la unión de su ligando o sus ligandos o anticuerpos (Sato, S. y col., Immunity 5:551-562 (1996)). Para ensayar si y cómo afecta el nivel de la expresión de superficie de linfocitos B de CD22 y/o internalización de CD22 a la eficacia, se realizaron los siguientes estudios *in vitro*.

Expresión de superficie de CD22 humano en múltiples líneas celulares de mieloma. Se cultivaron diecinueve líneas celulares de linfoma que expresaban diversas cantidades de CD22 en su superficie y se recogieron en crecimiento de fase logarítmica. Las células se resuspendieron en tampón de lavado FACS (PBS; albúmina de suero bovino al 0,5%; azida sódica 0,1 %) que contenía 100 µg/ml de cada IgG de ratón normal e IgG humano normal y se mantuvieron en hielo. Se tiñeron aproximadamente 1×10^6 células/100 µl con APC anti-huCD22 (mIgG1, clon RFB4, Southern Biotech N° 9361-11) o isotipo de APC IgG1 murino (BD Pharmingen N° 555751) durante 30 minutos en hielo. Las células muertas se tiñeron con 7-AAD (BD Pharmingen N° 559925). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo Bd FACS Calibur™ y se analizaron con software FlowJo™. La determinación de CI50 para hu10F4v3-SMCC-DM1 o cada fármaco libre (DM1, MMAF, o MMAE) se determinó cultivando células de linfoma como anteriormente, recogiendo las células cultivadas en fase logarítmica y sembrando 5.000 células en 90 µl de medio de cultivo por pocillo en placas de 96 pocillos. Se diluyeron el ADC y fármaco libre en serie dentro del intervalo de detección (comenzando a 300 µg/ml para ADC, o 90 nM para fármaco libre y diluyendo hasta esencialmente cero de diana de ensayo). Se añadieron alícuotas de 10 µl de ADC diluido o fármaco libre para repetir los pocillos que contenían células y se incubaron durante 3 días a 37 °C. A cada pocillo, se añadieron 100 µl de CellTiter Glo™ y se incubaron durante 30 minutos. Se detectó la quimioluminiscencia y se analizaron los datos usando software Prism™. Los resultados se muestran en la Figura 6A, en la que niveles altos de CD22 en superficie se correlacionan con CI50 baja (mayor eficacia) de Hu 10F4v3-SMCC-DM1. La Figura 6C indica que existe una correlación más fuerte entre la sensibilidad intrínseca de las células y fármaco libre y la CI50 del ADC.

Se determinó la internalización de hu10F4v3-SMCC-DM1 por ensayo de FACS. Brevemente, las células de linfoma se tiñeron por técnicas de FACS convencionales con CD22-FITC (RFB4) en presencia de hu10F4v3-SMCC-DM1 y se incubaron en hielo durante 20-30 minutos. Para determinar los niveles de CD22 en la superficie celular después de la tinción inicial, las células se lavaron en medio RPMI/FBS 10 % frío y se añadieron 200 µl de RPMI/FBS 10 % precalentado y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron 80 µl de tampón de tinción y 20 µl de suero de ratón normal inactivado por calor (HI NMS), seguido de incubación en hielo durante 15 minutos. Se añadió anti-DM1-Alexa-647, se incubó en hielo durante 20-30 minutos y las células se lavaron y se fijaron con 200 µl de PBS/paraformaldehído 1 % antes de análisis por FACS. Para determinar la tinción superficial interna de CD22 después de la tinción inicial, las células se lavaron con RPMI/FBS 10 % frío, se añadió RPMI/FBS 10 % precalentado y las células se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Las células se lavaron después con lavado de FACS y se fijaron con Reactivo Fix A (Dako™ N° k2311) a temperatura ambiente durante 15 minutos, y la etapa se repitió con Reactivo B Fix (Dako™). Se añadieron tampón de tinción HI NMS y la mezcla celular se incubó en hielo durante 15 minutos. Se añadió el Reactivo B Fix, seguido de anti-DM1-Alexa-647 y se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Las células se lavaron en lavado de FACS y se fijaron en PBS/paraformaldehído 1

%. Se realizó análisis de FACS en cada mezcla celular (tinción superficial, superficial post-internalización e interna) usando un citómetro de flujo BD FACS Calibur™ y se analizó con software FlowJo™. Los resultados se muestran en la Figura 6B en la que cantidades altas de DM1 internalizado se correlacionan con CI50 baja (alta eficacia); y en la Figura 6D en la que se visualiza DM1 internalizada por microscopía fluorescente.

Estudios de eficacia *in vivo*

Para ensayar la eficacia de anticuerpos monoclonales anti CD22 conjugados o no conjugados con toxina con respecto a la capacidad para reducir el volumen tumoral *in vivo*, se empleó el siguiente protocolo.

Se inoculó a cada uno de ratones SCID por vía subcutánea en el flanco 2×10^7 de una línea celular de linfoma de linfocitos B humano. Las líneas celulares humanas incluían las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano células de Daudi, Ramos y Raji (disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, Estados Unidos) y otras líneas de linfocitos B incluyendo células U-698-M y células Su-DHL-4 (disponibles de DSMZ, Braunschweig, Alemania; se transfectaron células Su-DHL-4 con el gen indicador de luciferasa), células DoHH2 (Kluin-Neilemans, H. C. (1991), mencionado anteriormente) y Granta-519 (células de linfoma de células del Manto, Jadayel, D. M. *et al.*, Leukemia 11(1): 64-72 (1997)), y células BJAB-luc (línea celular linfoblástico de linfocitos B humanos BJAB que expresa gen indicador de luciferasa). Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de entre 100 y 200 mm³, los ratones se dividieron en grupos, y se trataron el día 0 por inyección intravenosa con anticuerpo conjugado con toxina o anticuerpo no conjugado como se muestra en las Tablas 4-16, a continuación.

Los conjugados de fármaco maitansina y anti CD22 reducen el volumen tumoral de linfocitos B

Se inyectó a sesenta y cinco ratones SCID 2×10^7 células BJAB-luc por vía subcutánea en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en HBSS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en cuatro grupos de 9 ratones cada uno y se les proporcionó un tratamiento individual I.V. (a través de la vena de la cola) del anticuerpo anti CD22 o de control indicado en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4

Administración de Anticuerpo de Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i>						
Anticuerpo administrado	IT	PR	CR	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (μg/m ²)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
anti-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4,2	200	3,2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3,0	200	4,6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3,4	200	4,0
hu10F4v1	9/9	0	0	3,4	---	---

"IT"- incidencia tumoral en el último punto temporal de cada grupo; el numerador se refiere al número de animales portadores de tumores y el denominador se refiere al número total de animales. "PR" se refiere al número de animales con tumor que ha retrocedido 50-99% desde su volumen inicial. "CR" se refiere al número de animales que obtienen remisión completa.

Se controló el volumen tumoral medio en cada grupo de tratamiento durante 32 días después de la inyección del anticuerpo. Se tomaron mediciones tumorales con calibradores. La eficacia de los anticuerpos anti CD22 conjugados con toxina se determinó por comparación con los anticuerpos de control y no conjugados. Los resultados se muestran en la Figura 7A. Los anticuerpos monoclonales 10F4v1-smcc-DM1 murinos y humanizados ralentizaron significativamente el crecimiento tumoral en relación con anticuerpo anti CD22 no conjugado y anticuerpo de control no específico.

Usando el mismo protocolo que antes, se realizó un ensayo que comparaba el anticuerpo 10F4v2 humanizado conjugado con toxina con el murino y humanizado desnudo conjugado con toxina como se indica en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5

Administración de Anticuerpo de Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i>						
Anticuerpo administrado	IT	PR	CR	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
anti-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4,2	200	3,2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4,7	200	2,9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4,5	200	3,0
hu10F4v2	9/9	0	0	4,5	---	---
“IT”- incidencia tumoral en el último punto temporal de cada grupo; el numerador se refiere al número de animales con tumor en el grupo de estudio y el denominador se refiere al número total de animales. “PR” se refiere al número de animales con tumor que ha retrocedido 50-99% desde su volumen inicial. “CR” se refiere al número de animales que obtienen remisión completa.						

Se controló el volumen tumoral medio en cada grupo de tratamiento durante 32 días después de la inyección del anticuerpo. Se tomaron mediciones tumorales con calibradores. La eficacia de los anticuerpos anti CD22 conjugados con toxina se determinó por comparación con los anticuerpos de control y no conjugados. Los resultados se muestran en la Figura 7B. Los anticuerpos monoclonales 10F4-smcc-DM1 murino y 10F4v2-smcc-DM1 humanizado ralentizaron significativamente el crecimiento tumoral en relación con anticuerpo anti CD22 no conjugado y anticuerpo de control no específico.

- 5 El anticuerpo anti CD22 se conjugó con DM1 mediante el enlazador spp o el enlazador smcc de acuerdo con métodos de conjugación desvelados en la presente memoria. El anticuerpo anti CD20 desnudo se usó como un control positivo y los conjugados de toxina, anti-HER2-spp-DM1 y anti-HER2-smcc-DM1, se usaron como controles negativos. Se inyectó a ochenta ratones SCID 2 x 10⁷ células BJAB-luc por vía subcutánea en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en HBSS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en seis grupos de 10 ratones cada uno y se realizó inyección intravenosa de anticuerpos de ensayo o de control. Las dosis se repitieron una vez cada semana para un total de tres dosis. Véase Tabla 6.

Tabla 6

Administración de Anticuerpo de Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i>		
Anticuerpo Administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
anti-Her2-spp-DM1*	4	214
anti-Her2-smcc-DM1**	6,9	405
anti-CD22-spp-DM1*	5	214
anti-CD22-spp-DM1	2.5	107
anti-CD22-smcc-DM1**	10	405
anti-CD22 desnudo	10	---
* Carga farmacológica coincidente		
** Carga farmacológica coincidente		

El volumen tumoral medio se controló dos veces cada semana durante 3 semanas y después una vez cada semana en lo sucesivo durante un total de 8 semanas. Los cambios en el volumen tumoral a lo largo del tiempo (Figura 7C) muestran que el anti CD22-spp-DM1 dosificado a 214 y 104 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de DM1 anti CD22-smcc-DM1 dosificado a 405 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ mostraron actividad antitumoral robusta y comparable en tumores de xenoinjerto de BJAB-luc. Todos los grupos de ADC anti CD22 mostraron respuestas completas.

Los anticuerpos anti CD22, RFB4, 5E8, y 7A2 se conjugaron con DM1 mediante el enlazador smcc de acuerdo con métodos de conjugación desvelados en la presente memoria. El conjugado con toxina, anti HER2-smcc-DM1

(denominado de forma intercambiable en la presente memoria HER-smcc-DM1 o HER2-smcc-DM1) se usó como un control negativo.

Se examinó la capacidad de estos anticuerpos para reducir el volumen tumoral en diversos xenoinjertos en ratones SCID. Las líneas celulares de linfoma de linfocitos B humano usadas para generar tumores de xenoinjertos en ratones fueron células de Ramos y células de BJAB-luc. Para cada xenoinjerto, se inyectó a los ratones SCID 5×10^6 células de Ramos de linfoma de linfocitos B humano por vía subcutánea en un volumen de 0,1 ml por ratón en el flanco (o 2×10^7 células BJAB-luc en 0,2 ml). Las células se suspendieron en HBSS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de 8-10 ratones cada uno, y se proporcionó a cada ratón una inyección intravenosa individual de anticuerpo de ensayo o de control. La carga farmacológica de DM1 se normalizó a 200 µg/m² para cada grupo para proporcionar la dosis de DM1 administrada. El volumen tumoral medio se controló dos veces cada semana durante 4 semanas. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 7 y 8 y se representan en las Figuras 8A y 8B, respectivamente.

Tabla 7

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Anticuerpo de Xenoinjerto de Ramos		
Anticuerpo Administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (µg/m ²)
anti-HER2-smcc-DM1	4,2	200
Anti-CD22(7A2)-smcc-DM1	3,8	200
anti-CD22(5E8)-smcc-DM1	3,8	200
Anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3,2	200

Tabla 8

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Anticuerpo de Xenoinjerto de BJAB-luc			
Anticuerpo Administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (µg/m ²)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
anti-HER2- smcc-DM1	4,2	200	3,2
Anti-CD22 (7A2)-smcc-DM1	3,8	200	3,6
Anti- CD22(5E8)-smcc-DM1	3,8	200	3,6
Anti- CD22(RFB4)-smcc-DM1	3,2	200	4,25

Estos resultados muestran que los conjugados de fármaco y anticuerpo anti CD22-smcc-DM1 reducen significativamente el volumen tumoral de linfocitos B en xenoinjertos de Ramos y BJAB-luc en relación con el anticuerpo de control o anticuerpo anti CD22 desnudo.

Se examinó el efecto de la carga farmacológica de anticuerpo (número medio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo en una población de anticuerpos) sobre la capacidad de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti CD22-smcc-DM1 para reducir el volumen tumoral en xenoinjertos de ratones SCID de BJAB-luc. Se inyectó a ciento cuarenta ratones SCID 2×10^7 células BJAB-luc por vía subcutánea en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en HBSS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de 8-10 ratones cada uno, y se proporciona a cada ratón una inyección intravenosa individual de anticuerpo de ensayo o de control. Se administraron poblaciones de anti CD22(RFB4)-smcc-DM1 que tenían cargas farmacológicas relativas bajas, medias o altas (cargas farmacológicas medias de 1,95, 3,7 o 6,75 moléculas de DM1 conjugadas por anticuerpo, respectivamente) como los anticuerpos de ensayo. El anticuerpo RFB4 desnudo y anti GP120-smcc-DM1 (carga farmacológica alta) fueron los controles. Las dosis de conjugados de fármaco y anticuerpo (de ensayo y de control) se normalizaron a una dosis de 5 mg/kg de nivel de proteína. La unión de conjugado de enlazador con los anticuerpos fue mediante restos de lisina. Véase Tabla 9.

Tabla 9

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Anti CD22(RFB4)-smcc-DM1 de Xenoinjerto de BJAB-luc			
Anticuerpo Administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (µg/m ²)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
anti-CD22(RFB4) (anticuerpo desnudo)	10	--	--
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (bajo)	5	144	1,95

anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (medio)	5	273	3,7
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (alto)	5	497	6,75
anti-GP120-smcc-DM1 (alto)	5	449	6,1

Cuando se dosificó a un nivel de proteína coincidente (5 mg/kg), el anti CD22(RFB4)-smcc-DM1 cargado con una alta carga farmacológica (6,75 moléculas de DM1 por molécula de anticuerpo) redujo el volumen tumoral ligeramente más que el conjugado de fármaco y anticuerpo con una carga media de 3,7, mientras que los efectos del conjugado de fármaco y anticuerpo con una baja carga farmacológica no fue diferente del conjugado de control o anticuerpo desnudo. Los resultados se representan en la Figura 9.

Los conjugados de fármaco auristatina y anti CD22 reducen el volumen tumoral de linfocitos B

Se examinó el efecto de conjugados farmacológicos de MMAF de auristatina con anti CD22 en el volumen tumoral en xenoinjertos de ratón. Se conjugaron anticuerpo anti CD22(RFB4) y de control anti GP120 con MMAF mediante un enlazador MC-vcPAB o un enlazador MC de acuerdo con métodos desvelados en la presente memoria. Se inyectó a ratones SCID 5×10^6 células de Ramos por vía subcutánea en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en HBSS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de 8-10 ratones cada uno, y se proporcionó a cada ratón una inyección intravenosa individual de anticuerpo de ensayo o de control. La dosis farmacológica, carga farmacológica, (relación farmacológica) y dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Conjugado de MMAF con Anti CD22(RFB4) de Xenoinjerto de Ramos			
Anticuerpo Administrado	Dosis de MMAF ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
anti-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6,6	4,2
anti-CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6,9	4,0
anti-GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5,8	4,8
anti-GP120-MC-MMAF	405	5,9	4,7

El anti CD22-MC-MMAF mostró actividad comparable en comparación con anti CD22-MC-vc-PAB-MMAF en xenoinjertos RA1 de Ramos. Los resultados se representan en la Figura 10.

Se examinó el efecto de conjugados farmacológicos de MMAE y DM1 de auristatina con anti CD22 en el volumen tumoral en xenoinjertos de ratón. Se conjugaron anticuerpo anti CD22(RFB4) y de control anti GP120 con MMAE mediante un enlazador MC-vcPAB o un enlazador MC o con DM1 mediante un enlazador smcc de acuerdo con métodos desvelados en la presente memoria. Se inyectó a ratones SCID 5×10^6 células de Ramos por vía subcutánea en un volumen de 0,1 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en HBSS. PBS se administró como un control. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de 8-10 ratones cada uno, y se proporcionó a cada ratón una inyección intravenosa individual de anticuerpo de ensayo o de control. La dosis farmacológica, carga farmacológica, (relación farmacológica) y dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Conjugado de MMAE y DM1 con Anti CD22(RFB4) de Xenoinjerto de Ramos			
Anticuerpo Administrado	Dosis de MMAE o DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
Anti-GP120-smcc-DM1	405	6,7	4,1
Anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6,5	4,25
Anti-GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6,0	4,7
antiCD22 (RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6,3	4,5
PBS	--	--	--

El anti CD22-MCvcPAB-MMAE mostró potente actividad antitumoral en xenoinjertos RA1 de Ramos. El anti CD22-MCvcPAB-MMAE mostró actividad superior en comparación con anti CD22-smcc-DM1. El ADC de control, anti GP120-MCvcPAB-MMAE no mostró actividad significativa. Los resultados se representan en la Figura 11.

Se examinó el efecto de conjugados farmacológicos de MMAF y DM1 de auristatina con anti CD22 en el volumen tumoral en xenoinjertos de ratón. Se administraron anti CD22 hu10F4v2-MC-MMAF, hu10F4v2-smcc-DM1 y tio-10F4v1-MC-MMAF y se compararon con respecto a su efecto en el volumen tumoral. Los anticuerpos de control fueron anti Her2-MC-MMAF y anti Her2-smcc-DM1. Se inyectó a ratones SCID 2×10^7 células BJAB-luc por vía subcutánea en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en HBSS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de 8-10 ratones cada uno, y se proporcionó a cada ratón una inyección intravenosa individual de anticuerpo de ensayo o de control. "Tio" se refiere a TioMab, como se desvela en la presente memoria, en el que el resto farmacológico-enlazador se conjuga con el anticuerpo mediante un sitio modificado por ingeniería genética con cisteína en el anticuerpo. La dosis farmacológica, carga farmacológica, (relación farmacológica) y dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Conjugado de MMAF y DM1 con Hu10F4 de Xenoinjerto de BJAB-luc			
Anticuerpo Administrado	Dosis de MMAE o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (Restos de fármaco/Ab)
Anti-Her2-MC-MMAF	100	1,1	6,3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2,0	3,4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1,0	3,4
Tio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4,6	1,5
Tio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2,3	1,5
Anti-Her2-smcc-DM1	200	4,2	3,2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4,5	3,0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2,3	3,0

Los ADC Hu10F4v2 mostraron potente actividad antitumoral en xenoinjertos de BJAB-luc. Los resultados se representan en la Figura 12.

Usando procedimientos como los desvelados en los experimentos anteriores, se examinó la eficacia de ADC hu10F4v3-smcc-DM1 y -MC-MMAF en diferentes xenoinjertos a diferentes dosis. Se prepararon xenoinjertos de SuDHL4-luc, DoHH2, y xenoinjertos de Granta-519 como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 100-200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de 8-10 ratones cada uno, y se proporcionó a cada ratón una inyección intravenosa individual de anticuerpo de ensayo o de control. La dosis farmacológica, carga farmacológica (relación farmacológica) y dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestran en las Tablas 13A-13C y los resultados se muestran en las Figuras 13A-13C.

Tabla 13A

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Conjugado de MMAF y DM1 con Hu10F4v3 en Xenoinjertos de SuDHL-4-luc			
Anticuerpo Administrado	Dosis de MMAF o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (Fármaco/Ab)
Anti-Her2-smcc-DM1	600	11,9	3,3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13,6	2,9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6,8	2,9
Anti-Her2-MC-MMAF	600	9,9	4,0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13,3	3,0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6,6	3,0

Tabla 13B

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Conjugado de MMAF y DM1 con Hu10F4v3 en Xenoinjertos de DoHH2			
Anticuerpo Administrado	Dosis de MMAE o DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (Fármaco/Ab)
Anti-Her2-smcc-DM1	600	11,9	3,3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11,8	3,35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5,9	3,35
Anti-Her2-MC-MMAF	600	9,9	4,0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13,1	3,04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6,6	3,04
hu10F4v3 desnudo	--	13,1	--

Tabla 13C

Reducción del Volumen Tumoral <i>In Vivo</i> , Administración de Conjugado de MMAF y DM1 con Hu10F4v3 en Xenoinjertos de Granta-519			
Anticuerpo Administrado	Dosis de MMAE o DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (Fármaco/Ab)
Anti-Her2-smcc-DM1	300	5,9	3,3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5,9	3,35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2,9	3,35
Anti-Her2-MC-MMAF	300	4,9	4,0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6,6	3,04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3,3	3,04
hu10F4v3 desnudo	--	6,6	--

- 5 Los ADC anti CD22 hu10F4v3-smcc-DM1 y -MC-MMAF mostraron potente reducción tumoral en todos los modelos de xenoinjerto ensayados.

Ejemplo 10: Preparación de anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína

- 10 Se realizó preparación de anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína como se desvela en la presente memoria. Se mutó ADN que codificaba el anticuerpo 10F4v3, que tenía las mismas secuencias de región variable y constante que 10F4v2 (cadena ligera, SEC ID N°: 87; y cadena pesada, SEC ID N°: 88, Figura 5B) por métodos desvelados en la presente memoria para modificar la cadena ligera, la cadena pesada o la región Fc de la cadena pesada. El ADN que codificaba la cadena ligera se mutó para sustituir con cisteína valina en la posición de Kabat 205 en la cadena ligera (posición secuencial 210) como se muestra en la Figura 17A (cadena ligera SEC ID N°: 91 del anticuerpo humanizado 10F4v3 TioMab). El ADN que codificaba la cadena pesada se mutó para sustituir con cisteína alanina en la posición EU 118 en la cadena pesada (posición secuencial 121) como se muestra en la Figura 17B (cadena pesada SEC ID N°: 92 del anticuerpo humanizado 10F4v3 TioMab). La región Fc se mutó para sustituir con cisteína serina en la posición EU 400 en la región Fc de cadena pesada (posición secuencial 403) como se muestra en la Figura 17C (cadena pesada SEC ID N°: 93).

Preparación de anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína para conjugación por reducción y reoxidación.

- 25 Se disuelven anticuerpos monoclonales anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína, de longitud completa (TioMab), expresados en células CHO en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a aproximadamente pH 8,0 y se reducen con un exceso de aproximadamente 50-100 veces de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al* (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) 1 mM durante aproximadamente 1-2 horas a 37 °C. El TioMab reducido se diluye y se carga en una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro sódico 0,3 M. El TioMab reducido eluido se trata con ácido deshidroascórbico (dhAA) a pH 7 durante 3 horas, o sulfato de cobre acuoso (CuSO_4) 2 mM a temperatura ambiente durante una noche. También puede ser eficaz la oxidación de aire ambiental. El tampón se cambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se

comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducida desde la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm.

Ejemplo 11: Preparación de conjugados de fármaco y anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína mediante conjugación de anticuerpos anti CD22 modificados por ingeniería genética con cisteína e intermedios de enlazador farmacológico.

Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 10, el anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína se disuelve en tampón de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se enfría en hielo. Se disuelven aproximadamente 1,5 equivalentes molares en relación con cisteínas introducidas por ingeniería genética por anticuerpo de un intermedio de enlazador y fármaco auristatina, tal como MC-MMAE (maleimidocaproil-monometil auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional sensible a tiol tal como maleimido, en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua, y se añade al anticuerpo reducido, reoxidado, enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y proteger cualquier grupo tiol de anticuerpo no reaccionado. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y el conjugado de fármaco y anticuerpo anti CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles y se congela para almacenamiento.

Se realizó preparación de hu 10F4v3 HC(A118C) TioMab-BMPEO-DM1. La cisteína libre en hu 10F4v3 HC(A118C) TioMab se modificó por el reactivo de bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido no reaccionado en la superficie del anticuerpo. Esto se consiguió disolviendo BM(PEO)4 en una mezcla de etanol/agua al 50% a una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar diez veces de BM(PEO)4 a una solución que contenía hu4D5Fabv8-(V110C) TioFab en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y permitiendo que reaccionara durante 1 hora. Se retiró el exceso de BM(PEO)4 por filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en citrato 30 mM, pH 6 con tampón de NaCl 150 mM. Se añadió un exceso molar de aproximadamente 10 veces de DM1 disuelto en dimetil acetamida (DMA) al intermedio de hu4D5Fabv8-(V110C) TioFab-BMPEO. También se puede emplear dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo del resto farmacológico. Se permitió que la mezcla de reacción reaccionara durante una noche antes de la filtración en gel o diálisis en PBS para retirar el fármaco no reaccionado. Se usó filtración en gel en columnas S200 en PBS para retirar agregados de alto peso molecular y proporcionar hu 10F4v3 HC(A118C) TioMab-BMPEO-DM1 purificado.

Por los mismos protocolos, se prepararon HC (A118C) MAb-MC-MMAF de control, HC TioMAb-MC-MMAF de control, HCTioMAb-MCvcPAB-MMAE de control, y HC TioMab-BMPEO-DM1 de control.

Por los procedimientos anteriores, se prepararon y ensayaron los siguientes conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD22 modificado por ingeniería genética con cisteína:

tio hu tio-HC-10F4v3-MC-MMAF por conjugación de A118C tio hu 10F4v3 y MC-MMAF;

tio hu tio-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de A118C tio hu 10F4v3 y MC-val-cit-PABMMAE;

tio hu HC-10F4v3-bmpeo-DM1 por conjugación de A118C tio hu HC-10F4v3 y bmpeo-DM1;

tio hu LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de V205C tio hu LC-10F4v3 y MC-val-cit-PAB-MMAE;
y

tio hu Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de S400C tio hu Fc-10F4v3 y MC-val-cit-PAB-MMAE.

Ejemplo 12: caracterización de la afinidad de unión de conjugados farmacológicos de TioMAb modificados por ingeniería genética con cisteína por antígenos de superficie celular

Se determinó la afinidad de unión de conjugados farmacológicos de tio hu 10F4v3 con CD22 expresado en células BJAB-lucs por análisis de FACS. Brevemente, se pusieron en contacto aproximadamente 1×10^6 células en 100 µl con diversas cantidades de uno de los siguientes conjugados farmacológicos de TioMAb anti-CD22: tio hu LC(V205C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio hu Fc(S400C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio hu HC(A118C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio hu HC(A118C) 10F4v3-MC-MMAF o tio hu HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1 (véase Figuras 18A-18E, respectivamente). Se detectó anticuerpo anti-CD22 unido a la superficie celular usando anti-huFc de cabra biotinilado más estreptavidina-PE. Las representaciones de las Figuras 18A-18E indican que la unión a antígeno fue aproximadamente la misma para todos los conjugados farmacológicos de tiomab ensayados.

Ejemplo 13: ensayo para Reducción del Volumen Tumoral *in vivo* por conjugados farmacológicos de TioMab anti-CD22

La capacidad de los conjugados farmacológicos de tiomab preparados de acuerdo con el Ejemplo 11 para reducir el volumen tumoral de linfocitos B en modelos de xenoinjerto se ensayó de acuerdo con el procedimiento desvelado en el Ejemplo 9, en la presente memoria. Se administró a ratones SCID que tenían tumores de xenoinjerto de células Granta-519, conjugados de fármacos y tiomab 10F4v3 humanizado de control y anti-CD22 el Día 0 en las dosis mostradas en la Tabla 14, a continuación. El tiomab HC(A118C) de control fue anticuerpo anti-HER2 4D5.

Tabla 14

Reducción del Volumen Tumoral <i>in vivo</i> , administración de conjugado de MMAE y MMAF con Tio Hu10F4v3 en xenoinjertos de Granta-519			
Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (μ g/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (fármaco /Ab)
Tio HC(A118C)-MC-MMAF de control	100	3,99	1,65
Tio HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE de control	100	4,33	1,55
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3,41	1,95
Tio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4,23	1,6
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3,76	1,8
Tio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4,23	1,6

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 19. La administración de los conjugados de fármaco y tiomab tio 10F4v3-LC-(V205C)-MCvcPABMMAE y tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE a las dosis mostradas en la Tabla 14 provocó una reducción en el volumen tumoral medio durante el transcurso del estudio.

Se ensayaron conjugados de fármaco y tiomab adicionales en xenoinjertos de Granta-519 en ratones SCID CB17 usando el mismo protocolo, aunque se ensayaron dosis farmacológicas diferentes. El anticuerpo de control o tiomab de control fue anticuerpo anti-HER2 4D5 o tiomab HC(A118C). Los resultados se muestran en la Tabla 15, a continuación.

Tabla 15

Reducción del Volumen Tumoral <i>in vivo</i> , administración de conjugado de MMAE, MMAF y DM1 con Tio Hu10F4v3 en xenoinjertos de Granta-519			
Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (μ g/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (fármaco /Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3,2	3,1
Tio HC (A118C)-BMPEO-DM1 de control	300	10,3	1,9
Tio 10F4v3-HC (A118C)-BMPEO-DM1	150	5,2	1,9
Tio 10F4v3-HC (A118C)-BMPEO-DM1	300	10,4	1,9
Tio HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE de control	150	6,5	1,55
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5,3	1,9

Tio 10F4v3-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2,7	1,9
Tio HC (A118C)-MC-MMAF de control	150	5,2	1,9
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MC-MMAF	150	5,1	1,95
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MC-MMAF	75	2,6	1,95

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 20A. La administración del conjugado de fármaco y tiomab tio 10F4v3-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE a 150 y 75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ provocó una reducción en el volumen tumoral medio durante el transcurso del estudio. En el mismo estudio, el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 7 días se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados representados en la Figura 20B indican que la administración de estos conjugados farmacológicos de tiomab no provocaron pérdida de peso durante este tiempo.

En un estudio similar, usando el mismo protocolo de estudio de xenoinjerto que se ha desvelado en los ejemplos anteriores, variando los TDC y dosis administradas, se estudió la eficacia de los TDC en xenoinjertos de DOHH2 de linfoma folicular en ratones SCID CB17. Los TDC y las dosis se muestran en la Tabla 16, a continuación.

Tabla 16

Reducción del volumen tumoral <i>in vivo</i> , administración de conjugado de MMAE, MMAF y DM1 con Tio Hu10F4v3 en xenoinjertos de DOHH2			
Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Relación farmacológica (fármaco/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6,4	3,1
Tio HC (A118C)-BMPEO-DM1 de control	600	21,9	1,79
Tio 10F4v3-HC (A118C)-BMPEO-DM1	600	20,8	1,9
Tio 10F4v3-HC (A118C)-BMPEO-DM1	300	10,4	1,9
Tio HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE de control	600	26,0	1,55
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21,4	1,9
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10,7	1,9
Tio HC (A118C)-MC-MMAF de control	600	20,8	1,9
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MC-MMAF	600	20,4	1,95
Tio 10F4v3-HC (A118C)-MC-MMAF	300	10,2	1,95

La Figura 20C es un gráfico que representa cambios en el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en el xenoinjerto de linfoma folicular DOHH2 en ratones SCID CB17 tratados con los mismos TDC anti-CD22 A118C de cadena pesada, pero a dosis mayores como se muestra en la Tabla 16. El TDC anti-CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE parecía ser el más eficaz de los agentes de ensayo en este estudio. Sin embargo, a los niveles de dosis aumentados en este experimento, se observó alguna eficacia en los controles anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE. Esta actividad es posiblemente atribuible a la liberación del fármaco del ADC en circulación. Los agentes de ensayo anti-CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF y -BMPEO-DM1 mostraron eficacia intermedia y, de forma coherente con la estabilidad aumentada de estos enlazadores, los controles anti-HER2 no de unión mostraron

poca actividad. La Figura 20D es una representación del porcentaje de cambio de peso en los ratones del estudio de xenoinjerto DOHH2 que muestra que no hubo cambios significativos en el peso durante los primeros 14 días del estudio.

5 Ejemplo 14: seguridad de los conjugados farmacológicos anti-CD22 en ratas y monos cynomolgus

El anticuerpo anti-CD22 hu10F4 reacciona de forma cruzada con CD22 de mono cynomolgus (cyno) con una afinidad equivalente a CD22 humano. El anticuerpo anti-CD22 hu10F4 no reacciona de forma cruzada con CD22 de rata. Como resultado, se evaluó la seguridad y toxicidad independiente de diana y dependiente de diana de los conjugados farmacológicos anti-CD22 en rata y cyno, respectivamente.

Seguridad y toxicidad en ratas.

Para estudios de seguridad y toxicidad en ratas, se realizaron dos estudios. En un estudio, se suministró a ratas por vía intravenosa el Día 1 conjugados de hu10F4v3-SMCC-DM1, -SPP-DM1, -MC-vc-PAB-MMAE, o -MC-MMAF en los que el fármaco se enlazó mediante un enlazador escindible (-vc- o -spp-) o no escindible (MC o SMCC (también denominado MCC)). El vehículo se administró como el control. Se recogieron muestras sanguíneas el Día 5 para análisis farmacocinético, y el Día 12 (en el momento de la necropsia). Se realizaron observaciones clínicas y registros de peso corporal al menos tres veces a la semana. Se controló la AST (aspartato aminotransferasa) en suero como un indicio de toxicidad. Los niveles de AST en suero aumentaron el Día 5 en relación con el Día 0 en ratas a las que se suministró hu10F4v3-vcMMAE y hu10F4v3-SPP-DM1 20 mg/kg que comprendían enlazadores escindibles (Figura 21A). Los niveles de neutrófilos aumentaron el Día 5 en relación con el Día 0 en ratas a las que se suministró hu10F4v3-MCMMAF o hu10F4v3-MCC-DM1 20 mg/kg (enlazadores no escindibles, Figura 21B). Los niveles de neutrófilos se redujeron el Día 5 en relación con el Día 0 en ratas a las que se suministró hu10F4v3-vc-MMAE o hu10F4v3-SPP-DM1. El aumento de AST en suero y reducción de neutrófilos en ratas a las que se suministró ADC que comprendían enlazadores escindibles indica aumento de la toxicidad en dichos ADC.

En el mismo estudio de ratas, se suministró a seis animales por grupo 20, 40 o 60 mg/kg de hu10F4v3-MC-MMAF o hu10F4v3-SMCC-DM1 el Día 1 y se controlaron durante doce días. En animales a los que se suministró hu10F4v3-MC-MMAF, no hubo observaciones de los siguientes indicadores: reducción de peso corporal, aumentos de las enzimas del hígado en suero, reducciones de plaquetas o reducciones de neutrófilos. En ratas a las que se suministró hu10F4v3-SMCC-DM1, se observaron aumento reversible del peso corporal y aumentos reversibles de las enzimas del hígado en suero a niveles de dosis de 40 y 60 mg/kg, mientras que se observaron reducciones reversibles de neutrófilos y reducciones transitorias de plaquetas a dosis de 60 mg/kg.

Seguridad y toxicidad en monos cynomolgus.

Para evaluar la seguridad y toxicidad de ADC anti-CD22 en un modelo de primate, se asignaron treinta monos cyno a los siguientes grupos de tratamiento: control de vehículo (6 animales), hu10F4v3-SMCC-DM1 a dosis de 2, 4, y 6 mg/m² de dosis farmacológica (equivalente a 0, 10, 20 y 30 mg/kg de dosis de anticuerpo; 4 animales por grupo de dosificación) y hu10F4v3-MC-MMAF a dosis de 2, 4, y 6 mg/m² (4 animales por grupo de dosificación). Se dosificó a los animales por vía intravenosa el Día 1 y Día 22. Los animales se evaluaron con respecto a cambios en el peso corporal, consumo de alimentos e índices patológicos. Se recogieron y ensayaron muestras de sangre para evaluar los efectos del anticuerpo antifármaco, toxicológicos y farmacodinámicos. La mitad de los animales de cada grupo se sacrificó en cada uno del Día 25 y Día 43 y se recogieron muestras tisulares.

No se observaron cambios de peso corporal notables en ninguno de los grupos de ADC. Los niveles de las enzimas del hígado en suero AST (aspartato aminotransferasa), ALT (aminotransferasa) y GGT (gamma-glutamyltranspeptidasa) se ensayaron de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en las técnicas relevantes. Se observaron aumentos reversibles de enzimas del hígado en suero en animales a los que se suministró 30 mg/kg con uno de los ADC, aunque ALT estaba elevada en el grupo DM1, mientras que AST y GGT estaban elevadas en el grupo de MMAF. La degeneración del nervio ciático fue de mínima a leve en el grupo de DM1 en 2 de 4 animales a una dosis de 20 mg/kg y en 4 de 4 animales a una dosis de 30 mg/kg. La degeneración del nervio ciático fue mínima en el grupo de MMAF en 1 de 4 animales a una dosis de 30 mg/kg. Se examinó microscópicamente el tejido de diversos órganos. Dos de cuatro animales en el grupo de MMAF 30 mg/kg tuvo lesiones pulmonares de importancia desconocida, mientras que no se observó ninguna en el grupo de DM1.

El agotamiento de linfocitos B periféricos por los ADC hu10F4v3-MC-MMAF y -SMCC-DM1 se determinó midiendo los niveles de células CD20+ en sangre durante 43 días en monos cyno dosificados el Día 0 y Día 22. Se ensayó sangre recogida periódicamente durante el estudio por FACS usando un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia. Los ADC de MMAF y DM1 anti-CD22 agotan linfocitos B periféricos de cyno como se muestra en la Figura 22A (grupo de MMAF) y Figura 22B (grupo DM1). No se observaron efectos significativos de ADC de MMAF o DM1 para otras poblaciones de linfocitos como se muestra en las Figuras 23A y 23B en las que se muestra que las células CD4+ no se agotaron significativamente durante el mismo periodo de tiempo.

Hu10F4v3-SMCC-DM1 agotó los linfocitos B del centro germinal en las muestras de amígdala de mono cyno en relación con el control como se muestra en las microfotografías de las Figuras 24A y 24B. Los centros germinales ilustrativos están rodeados en la Figura 24A. Se observó anulación completa de los linfocitos B del centro germinal al nivel de dosis de 10 mg/kg como se muestra en la Figura 24B. Se obtuvieron los mismos resultados después de la administración del ADC hu10F4v3-MC-MMAF en las mismas condiciones.

Hu10F4v3-MC-MMAF dosificado a 10 mg/kg agotó los linfocitos B en división de los centros germinales foliculares del bazo de monos cyno. Véase el diagrama de la Figura 25A y las microfotografías tisulares de las Figuras 25B y 25C. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se ensayó el ADC hu10F4v3-SMCC-DM1 en las mismas condiciones. Los centros germinales aparecen como regiones oscuras en la Figura 25B usando tinción Ki-67 y como áreas no teñidas rodeadas por regiones oscuras cuando se tiñen con anti-IgD marcado de forma detectable en la Figura 25D. La pérdida de los centros germinales debido al agotamiento de linfocitos B del centro germinal por anti-10F4v3-MC-MMAF se muestra en las Figuras 25C y 25E. Por lo tanto, estos fármacos antimitóticos tienen un impacto en las poblaciones de linfocitos B en proliferación.

Los siguientes hibridomas se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, Estados Unidos (ATCC):

Líneas celulares	Nº de referencia ATCC	Fecha de depósito
Hibridoma 10F4.4.1	PTA-7621	26 de mayo de 2006
Hibridoma 5E8.1.8	PTA-7620	26 de mayo de 2006

Estos depósitos se realizaron según las cláusulas del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Fin de Procedimiento de Patente y las Regulaciones del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un depósito viable durante 30 años desde la fecha del depósito. Estas líneas celulares se pusieron a disposición por la ATCC según las condiciones del Tratado de Budapest, y sometidas al acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de las líneas celulares al público tras la emisión de la Patente de Estados Unidos pertinente o tras la apertura al público de cualquier Solicitud de Patente de Estados Unidos o extranjera, lo que suceda primero, y asegura la disponibilidad de las líneas celulares para alguien que el Comisario de Patentes y Marcas de Estados Unidos determina que tiene derecho a ello según 35 USC §122 y las normas del Comisario con respecto a lo mismo (incluyendo 37 CFR §1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si las líneas celulares depositadas se perdieran o destruyeran cuando se cultiven en condiciones adecuadas, se reemplazarán rápidamente tras la notificación con una muestra de la misma línea celular. La disponibilidad de las líneas celulares depositadas no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle por medio de ilustración y ejemplo para fines de claridad de entendimiento, las descripciones y ejemplos no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Listado de secuencias

<110> EBENS, JR., ALLEN J. ET AL.

<120> ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P2262R1

<150> US 60/911.829

<151> 13-04-2007

<150> US 60/908.941

<151> 29-03-2007

<150> US 60/809.328

<151> 30-05-2006

<160> 93

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

5

<400> 1

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 2

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
5 10

20

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

30

<400> 3

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

35

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> secuencia sintetizada

<400> 4

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

Phe Lys Gly

45

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 5

5

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu
1				5					10					15
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20				25						30

Ala Arg

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 6

10

15

Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
				5					10	

20

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 7

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				5					10	

30

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 8

40

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1					5				10				15	
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys							
				20										

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

5

<400> 9

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

30

<400> 11

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 12

35

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> secuencia sintetizada

<400> 12

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
5

45

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 13

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

5

<210> 14

<211>9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

15 <400> 14

Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr
			5					

<210> 15

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia sintetizada

<400> 15

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			5						10

30

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 16

40

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

<210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 18

10

```

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
           20           25           30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
           35           40           45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
           50           55           60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
           65           70           75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
           80           85           90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
           95          100          105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           110

```

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 19

```

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu
 1           5           10           15

```

Glu

25

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 20

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

5 <210>21
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia sintetizada

<400> 21

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

15 <210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia sintetizada

<400> 22

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

25 <210> 23
<211> 16
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintetizada

35 <400> 23

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

40 <210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia sintetizada

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 25

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

Ile Lys

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 26

5

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

<210> 27

<211> 847

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 27

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

15

				80					85					90
Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asp	Lys	Asn	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser
				95					100					105
Ile	His	Pro	Val	His	Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg
				110					115					120
Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	Arg	Ile	His	Leu	Asn
				125					130					135
Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	His	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu
				140					145					150
Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Phe
				155					160					165
Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly
				170					175					180
Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile
				185					190					195
Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp
				200					205					210
Ser	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Asp
				215					220					225
Gly	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His
				230					235					240
Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Ile	Val
				245					250					255
Arg	Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser
				260					265					270
Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser
				275					280					285
Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Thr	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Thr
				290					295					300
Lys	Asp	Gln	Ser	Gly	Lys	Tyr	Cys	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Asp	Val
				305					310					315
Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Glu	Glu	Val	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala
				320					325					330
Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Val	Gln	Ile	Leu	His	Ser	Pro	Ala	Val	Glu
				335					340					345
Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu
				350					355					360
Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Gln	Gly
				365					370					375
Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val	His	Ile	Pro	Lys	Ile	Leu	Pro	Trp	His
				380					385					390
Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Gly

395										400					405				
Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Lys					
				410					415					420					
Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly					
				425					430					435					
Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ser					
				440					445					450					
Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro					
				455					460					465					
Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr					
				470					475					480					
Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Arg	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser					
				485					490					495					
Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val					
				500					505					510					
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val					
				515					520					525					
Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln					
				530					535					540					
Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln					
				545					550					555					
Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser					
				560					565					570					
Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp					
				575					580					585					
Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met					
				590					595					600					
Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr					
				605					610					615					
Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe					
				620					625					630					
Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	His	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg					
				635					640					645					
Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln					
				650					655					660					
Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu					
				665					670					675					
Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Val					
				680					685					690					
Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Cys	Gly					
				695					700					705					
Leu	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly					

710										715				720		
Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys		
				725					730					735		
Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly		
				740					745					750		
Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu		
				755					760					765		
Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Ser		
				770					775					780		
Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Thr	Cys	Asp	Asp	Thr	Val	Thr		
				785					790					795		
Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val		
				800					805					810		
Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	His	Tyr	Ser	Glu	Leu		
				815					820					825		
Ile	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Pro	Gln	Ala	Gln	Glu	Asn	Val		
				830					835					840		
Asp	Tyr	Val	Ile	Leu	Lys	His										
				845												

<210> 28
 <211> 660
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 28

5

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

				140						145				150
Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala
				155					160					165
Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg
				170					175					180
Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	Ser	His	His	Gly	Lys	Ile
				185					190					195
Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Asp	Gly	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn
				200					205					210
Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ile
				215					220					225
Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Ile	Val	Arg	Glu	Gly	Asp	Ser	Val
				230					235					240
Thr	Met	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Thr
				245					250					255
Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Thr
				260					265					270
Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Thr	Lys	Asp	Gln	Ser	Gly	Lys
				275					280					285
Tyr	Cys	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Glu
				290					295					300
Glu	Val	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Val
				305					310					315
Gln	Ile	Leu	His	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe
				320					325					330
Leu	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp
				335					340					345
Tyr	His	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val
				350					355					360
His	Ile	Pro	Lys	Ile	Leu	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys
				365					370					375
Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Gly	Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala
				380					385					390
Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Lys	Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile
				395					400					405
Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser
				410					415					420
Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp
				425					430					435
Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys
				440					445					450
Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Arg

455					460					465				
Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val
				470					475					480
Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu
				485					490					495
Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe
				500					505					510
Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn
				515					520					525
Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile
				530					535					540
Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser
				545					550					555
Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr
				560					565					570
Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met	Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val
				575					580					585
Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn
				590					595					600
Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe	Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser
				605					610					615
Leu	Pro	His	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val
				620					625					630
Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Gly
				635					640					645
Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro
				650					655					660

<210> 29
 <211> 647
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 29

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

80										85				90			
Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asp	Lys	Asn	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	95	100	105
Ile	His	Pro	Val	His	Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg	110	115	120
Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	Arg	Ile	His	Leu	Asn	125	130	135
Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	His	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu	140	145	150
Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Phe	155	160	165
Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	170	175	180
Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	185	190	195
Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	200	205	210
Ser	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Asp	215	220	225
Gly	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	230	235	240
Pro	Pro	Lys	Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile	245	250	255
Arg	Glu	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	260	265	270
Asn	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	275	280	285
Glu	Glu	Pro	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	290	295	300
Asp	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	305	310	315
Trp	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	320	325	330
Val	Arg	Val	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	335	340	345
Asn	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	350	355	360
Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	365	370	375
Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	380	385	390
Ser	Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser			

	395		400		405									
Lys	Ala	Trp	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg
	410								415					420
Val	Ser	Met	Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala
				425					430					435
Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr
				440					445					450
Thr	Trp	Phe	Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	Gln
				455					460					465
Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr
				470					475					480
Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu
				485					490					495
Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg
				500					505					510
Val	Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala
				515					520					525
Ile	Cys	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser
				530					535					540
Gln	Gln	Gly	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val
				545					550					555
Arg	Asn	Lys	Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His
				560					565					570
Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr
				575					580					585
Thr	Thr	Leu	Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Asp
				590					595					600
Ala	Glu	Ser	Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Pro	Asp	Cys	Asp	Asp
				605					610					615
Thr	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Thr	Met
				620					625					630
Arg	Thr	Ser	Phe	Gln	Ile	Phe	Gln	Lys	Met	Arg	Gly	Phe	Ile	Thr
				635					640					645

Gln Ser

<210> 30
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

Ser	Lys	Trp	Val	Phe	Glu	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Tyr	Ala	Trp	Glu
1				5					10					15
Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Ile	Pro	Cys	Thr	Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Gly

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

				335						340					345
Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	
				350					355					360	
Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	
				365					370					375	
Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	Thr	Leu	Glu	
				380					385					390	
Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met	Ser	Pro	Gly	
				395					400					405	
Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ser	
				410					415					420	
Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe	Asp	Trp	Asn	
				425					430					435	
Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	
				440					445					450	
Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Asn	
				455					460					465	
Ser	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Tyr	
				470					475					480	

Tyr Ser Pro

5 <210> 31
 <211> 846
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

10 <400> 31

ES 2 567 402 T3

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

	125		130		135
Ser Glu Arg Pro	Phe 140	Pro Pro Arg Ile	Gln 145	Leu Pro Pro Lys	Leu 150
Gln Glu Ser Gln	Glu 155	Val Thr Leu Thr	Cys 160	Leu Leu Asn Phe	Ser 165
Cys Tyr Gly Tyr	Gln 170	Ile Gln Leu Gln	Trp 175	Leu Leu Glu Gly	Ala 180
Pro Met Arg Gln	Ala 185	Ala Val Thr Leu	Thr 190	Ser Leu Ser Thr	Lys 195
Ser Val Phe Thr	Arg 200	Ser Glu Leu Lys	Phe 205	Ser Pro Gln Trp	Ser 210
His His Gly Lys	Ile 215	Val Thr Cys Glu	Leu 220	His Asp Val Asp	Gly 225
Lys Val Leu Ser	Glu 230	Asp Thr Val Gln	Leu 235	Asn Val Lys His	Thr 240
Pro Lys Leu Thr	Ile 245	Glu Val Thr Pro	Asn 250	Glu Thr Ile Val	Arg 255
Lys Gly Asp Ser	Val 260	Thr Met Thr Cys	Lys 265	Val Asn Ser Ser	Asn 270
Pro Glu Tyr Thr	Thr 275	Val Ser Trp Leu	Lys 280	Asp Asp Ile Pro	Leu 285
Lys Glu Gln Asn	Thr 290	Leu Met Leu Thr	Leu 295	His Glu Val Thr	Lys 300
Ser Gln Thr Gly	Thr 305	Tyr Cys Cys Arg	Val 310	Ser Asn Asp Val	Gly 315
Pro Ala Thr Ser	Glu 320	Lys Val Phe Leu	Gln 325	Val Gln Tyr Ala	Pro 330
Glu Pro Ser Arg	Val 335	Gln Ile Ser Gln	Ser 340	Pro Ala Val Glu	Gly 345
Ser Glu Val Asn	Phe 350	Leu Cys Ile Ser	Pro 355	Ala Asn Pro Leu	Pro 360
Thr Asn Tyr Thr	Trp 365	Tyr His Asn Gly	Lys 370	Glu Val Gln Gly	Arg 375
Thr Glu Lys Gln	Phe 380	Gln Ile Gln Lys	Ile 385	Leu Pro Trp His	Ala 390
Gly Thr Tyr Ser	Cys 395	Val Ala Glu Asn	Ile 400	Leu Gly Ile Gly	Glu 405
Arg Gly Pro Gly	Thr 410	Glu Leu Asp Val	Gln 415	Tyr Pro Pro Lys	Lys 420
Val Thr Met Val	Ile 425	Glu Asn Pro Thr	Pro 430	Ile Arg Glu Gly	Asp 435
Thr Val Thr Leu	Ser	Cys Asn Tyr Ser	Ser	Ser Ser Asn Pro	Ile Val

440										445				450			
Asn	His	Tyr	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro	Ser			
				455					460					465			
Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Ile	Gly	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala			
				470					475					480			
Val	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Asn	Asn	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser	Pro			
				485					490					495			
Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Arg			
				500					505					510			
Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Leu	Val	Ser			
				515					520					525			
Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln	Phe			
				530					535					540			
Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	Leu			
				545					550					555			
Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys			
				560					565					570			
Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	Thr			
				575					580					585			
Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met	Ser			
				590					595					600			
Gln	Gly	Asn	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Thr	Ala	Ile	Leu	Thr	Cys			
				605					610					615			
Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp			
				620					625					630			
Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Tyr	Ser	Gly	Arg	Met	Leu	Arg	Leu			
				635					640					645			
Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	Gly			
				650					655					660			
Thr	Asn	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	His	Ser	Pro	Leu	Ile	Thr	Leu	Thr			
				665					670					675			
Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Val	Gly			
				680					685					690			
Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Met	Cys	Gly	Phe			
				695					700					705			
Lys	Val	Gln	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly	Leu			
				710					715					720			
Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys	Lys			
				725					730					735			
Val	Arg	Arg	Thr	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly	Cys			
				740					745					750			
Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Ala	Thr	Leu	Arg			

	755		760		765									
Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	Thr	Pro	Arg	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Thr	Ser
				770					775					780
Glu	Leu	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Cys	Asp	Asp	Thr	Val	Thr	Tyr
				785					790					795
Ser	Val	Leu	Gln	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val	Ile
				800					805					810
Pro	Asp	Phe	Pro	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	His	Tyr	Ser	Glu	Leu	Ile
				815					820					825
Gln	Phe	Gly	Phe	Gly	Glu	Arg	Pro	Gln	Ala	Gln	Glu	Asn	Val	Asp
				830					835					840
Tyr	Val	Ile	Val	Lys	His									
				845										

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 32

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Ala	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15

Glu

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 33

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15

Glu

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 34

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

<210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 35

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

<210> 36
 <211> 847

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

5

Met	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Tyr
1				5					10					15
Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Val	Phe	Glu	His	Pro	Glu

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

335										340					345				
Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe	Leu	Cys	Met		Ser	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu				
				350						355					360				
Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His	Asn		Gly	Lys	Glu	Met	Gln	Gly				
				365						370					375				
Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val	His	Ile	Pro		Lys	Ile	Leu	Pro	Trp	His				
				380						385					390				
Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Glu		Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Gly				
				395						400					405				
Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp		Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Lys				
				410						415					420				
Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro		Met	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly				
				425						430					435				
Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr		Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ser				
				440						445					450				
Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His		Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro				
				455						460					465				
Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn		Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr				
				470						475					480				
Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Arg	Cys	Asn	Ser		Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser				
				485						490					495				
Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala		Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val				
				500						505					510				
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile		His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val				
				515						520					525				
Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser		His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln				
				530						535					540				
Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu		Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln				
				545						550					555				
Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu		Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser				
				560						565					570				
Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln		Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp				
				575						580					585				
Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg		Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met				
				590						595					600				
Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly		Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr				
				605						610					615				
Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val		Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe				
				620						625					630				
Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	His		His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg				
				635						640					645				
Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser		Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln				

	650		655		660
Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu	665		670		675
Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val	680		685		690
Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly	695		700		705
Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly	710		715		720
Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys	725		730		735
Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly	740		745		750
Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu	755		760		765
Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser	770		775		780
Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr	785		790		795
Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val	800		805		810
Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu	815		820		825
Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val	830		835		840
Asp Tyr Val Ile Leu Lys His	845				

<210> 37
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

<210> 38
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1           5           10           15
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20           25           30
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
35           40           45
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50           55           60
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
65           70           75
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80           85           90
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
95           100          105
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
110          115          120
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125          130          135
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140          145          150
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
155          160          165
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
170          175          180
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
185          190          195
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
200          205          210
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

```

5 <210> 39
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 39

Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	1	5	10	15
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	20	25	30	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	35	40	45	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	50	55	60	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	65	70	75	
Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	80	85	90	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	95	100	105	
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	110	115	120	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	125	130	135	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	140	145	150	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	155	160	165	
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	170	175	180	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	185	190	195	
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	200	205	210	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	215											

<210> 40
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40

Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	1	5	10	15
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	20	25	30	
Thr	Cys	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	35	40	45	
Lys	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	50	55	60	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	65	70	75	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	80	85	90	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	95	100	105	
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	110	115	120	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	125	130	135	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	140	145	150	
Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	155	160	165	
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	170	175	180	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Cys	185	190	195	
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	200	205	210	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	215											

<210> 41
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

Pro	Ala	Pro	Glu	Phe 5	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 10	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 15
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 20	Thr	Leu	Met	Ile	Ser 25	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 30
Thr	Cys	Val	Val	Val 35	Asp	Val	Ser	Gln	Glu 40	Asp	Pro	Glu	Val	Gln 45
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 50	Asp	Gly	Val	Glu	Val 55	His	Asn	Ala	Lys	Thr 60
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 65	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr 70	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 75
Val	Leu	Thr	Val	Leu 80	His	Gln	Asp	Trp	Leu 85	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 90
Lys	Cys	Lys	Val	Ser 95	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro 100	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys 105
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 110	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 115	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 120
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 125	Gln	Glu	Glu	Met	Thr 130	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 135
Leu	Thr	Cys	Leu	Val 140	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 145	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 150
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 155	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 160	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 165
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 170	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 175	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg 180
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				185					190					195
Cys	Ser	Val	Met	His 200	Glu	Ala	Leu	His	Asn 205	His	Thr	Tyr	Gln	Lys 210
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 215	Leu	Gly	Lys							

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintetizada

<400> 42

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
1 5 10 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 43

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 44
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 44

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 45
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 45

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 46

5

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 47

<211> 14

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

15

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

25

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 49

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

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

35

<210> 50

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 50

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20

25

ES 2 567 402 T3

<210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 51

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 5 10
 10 <210> 52
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 52

 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 Ala
 20 <210> 53
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 53

 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 30 <210> 54
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54

 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30
 35

 40 <210> 55
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 56

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 58

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 59
<211> 31
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 59

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 60
<211> 30
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

5

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

15

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

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

25

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 63

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

35

<210> 64

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 64

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 66
<211> 31
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 68

ES 2 567 402 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

<210> 69
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ser Arg

<210> 70
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ser

<210> 71
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala Arg

<210> 72
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 77

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 10

 10 <210> 78
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 78

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 5 10

 20 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 79

 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

 25 <210> 80
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 30 <400> 80

 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15

 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 20 25 30

 Tyr Cys

 35 <210> 81
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 40 <400> 81

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

 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5
 <400> 82

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

10
 <210> 83
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15
 <400> 83

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

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

20
 <210> 84
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25
 <400> 84

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

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

30
 <210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

35
 <210> 86
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 86

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 87

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia sintetizada

<400> 87

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val
				20					25					30
His	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
				35					40					45
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
				50					55					60
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80					85					90
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
				95					100					105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				110					115					120
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
				125					130					135
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
				140					145					150
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
				155					160					165
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				170					175					180
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
				185					190					195
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
				200					205					210
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				215										

<210> 88
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

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

					320						325				330
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
				335					340					345	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
				350					355					360	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
				365					370					375	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
				380					385					390	
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
				395					400					405	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				410					415					420	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				425					430					435	
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
				440					445					450	

<210> 89
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 89

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

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 90

10

```

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

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
              20              25              30

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

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

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
              65              70              75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
              80              85              90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
              95              100             105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              110
    
```

<210> 91
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 91

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	20	25	30	
His	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	35	40	45	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	50	55	60	
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	65	70	75	
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	80	85	90	
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	95	100	105	
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	110	115	120	
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	125	130	135	
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	140	145	150	
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	155	160	165	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	170	175	180	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	185	190	195	
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	200	205	210	
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	215									

<210> 92

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 92

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser	20	25	30	
Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp	95	100	105	
Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	110	115	120	
Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	125	130	135	
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	140	145	150	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	155	160	165	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser				

	170		175		180
Gly Leu Tyr Ser	Leu Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser	Ser		
	185		190		195
Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro	Ser		
	200		205		210
Asn Thr Lys Val	Asp Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp	Lys		
	215		220		225
Thr His Thr Cys	Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly	Gly		
	230		235		240
Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu	Met		
	245		250		255
Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val	Ser		
	260		265		270
His Glu Asp Pro	Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly	Val		
	275		280		285
Glu Val His Asn	Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn		
	290		295		300
Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu	Thr Val Leu His Gln	Asp		
	305		310		315
Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys	Ala		
	320		325		330
Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala Lys Gly	Gln		
	335		340		345
Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Glu	Glu		
	350		355		360
Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly	Phe		
	365		370		375
Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln	Pro		
	380		385		390
Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp	Gly		
	395		400		405
Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg	Trp		
	410		415		420
Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala	Leu		
	425		430		435
His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	Lys		
	440		445		450

<210> 93

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 93

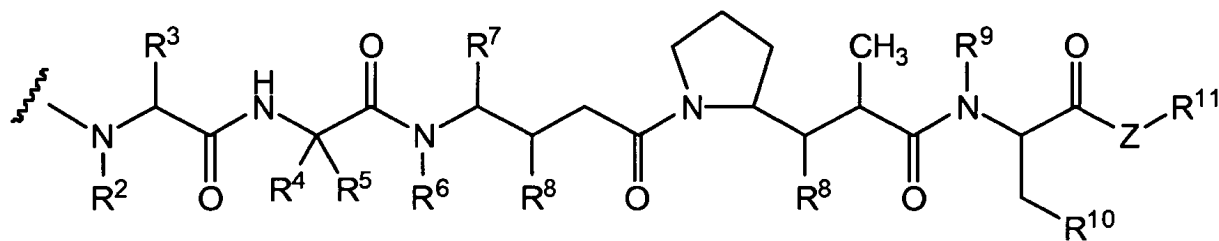
5

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

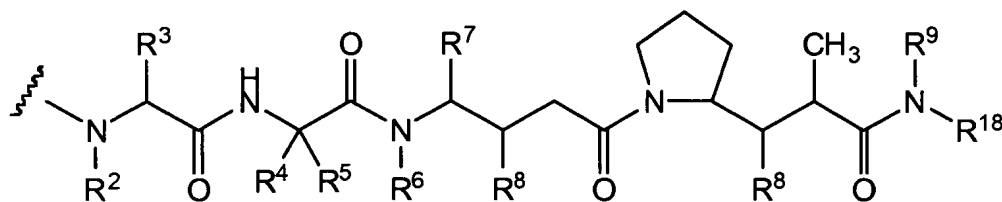
					305						310				315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
				320					325					330	
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
				335					340					345	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
				350					355					360	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
				365					370					375	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
				380					385					390	
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Cys	Asp	Gly	
				395					400					405	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				410					415					420	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				425					430					435	
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
				440					445					450	

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo unidos covalentemente a un agente citotóxico, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une a CD22 y (i) comprende una cadena pesada de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 88, y una cadena ligera de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 87; o (ii) es un anticuerpo de longitud completa en el que las cadenas pesadas tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 88 y las cadenas ligeras tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 87.
2. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 88 y una cadena ligera de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 87.
3. El inmunoconjugado de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el CD22 es CD22 de mamífero.
4. El inmunoconjugado de la reivindicación 3, en el que el CD22 es CD22 humano.
5. El inmunoconjugado de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo se une a un epítipo dentro de una región de CD22 de los aminoácidos 22 a 240 de SEC ID N°: 27.
6. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno se selecciona de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂.
7. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente citotóxico se selecciona de una toxina, un agente quimioterapéutico, un resto farmacológico, un antibiótico, un isótopo radiactivo y una enzima nucleolítica.
8. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, teniendo el inmunoconjugado la fórmula Ab-(L-D)_p, en donde:
 - (a) Ab es el anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
 - (b) L es un enlazador que comprende uno o más componentes enlazadores;
 - (c) D es un resto farmacológico.
9. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en el que:
 - (i) L se selecciona de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit o vc), alanina-fenilalanina (ala-phe), *p*-aminobenciloxycarbonilo (PAB), *N*-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), *N*-succinimidil 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC) y *N*-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB);
 - (ii) el enlazador está unido al anticuerpo mediante un grupo tiol en el anticuerpo;
 - (iii) el enlazador es escindible mediante una proteasa;
 - (iv) el enlazador comprende un dipéptido de valina-citrulina (val-cit o vc);
 - (v) el enlazador comprende una unidad de *p*-aminobenzilo, que opcionalmente es *p*-aminobenziloxycarbonilo (PAB);
 - (vi) el enlazador comprende un 6-maleimidocaproilo (MC); o
 - (vii) el enlazador comprende un 6-maleimidocaproilo (MC), un dipéptido de valina-citrulina (val-cit o vc) y un *p*-aminobenziloxycarbonilo (PAB).
10. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en el que D se selecciona de una auristatina y una dolastatina.
11. El inmunoconjugado de la reivindicación 10, en el que D es un resto farmacológico de fórmulas DE o DF:



DF



DE

y en donde R₂ y R₆ son cada uno metilo, R₃ y R₄ son cada uno isopropilo, R₇ es *sec*-butilo, cada R₈ se selecciona independientemente de CH₃, O-CH₃, OH y H; R₉ es H; R₁₀ es arilo; Z es -O- o -NH-; R₁₁ es H, alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R₁₈ es -C(R₈)₂-C(R₈)₂-arilo; y

5

(d) p varía de aproximadamente 1 a 8.

12. El immunoconjugado de la reivindicación 11, en el que el fármaco se selecciona de MMAE y MMAF.

10 13. El immunoconjugado de la reivindicación 8, en el que el immunoconjugado tiene la fórmula: Ab-(L-MMAE)_p, en la que L es un enlazador y p varía de 2 a 5, o tiene la fórmula: Ab-(L-MMAF)_p, en la que L es un enlazador y p varía de 2 a 5.

15 14. El immunoconjugado de la reivindicación 13, en el que L comprende val-cit (vc), MC, PAB, MC-PAB o MC-vc-PAB.

15. El immunoconjugado de las reivindicaciones 8 o 14, en el que L es MC-vc-PAB; y D es MMAE o MMAF.

20 16. El immunoconjugado de la reivindicación 8 en el que D es un maitansinoide.

17. El immunoconjugado de la reivindicación 16, en el que D se selecciona de DM1, DM3 y DM4.

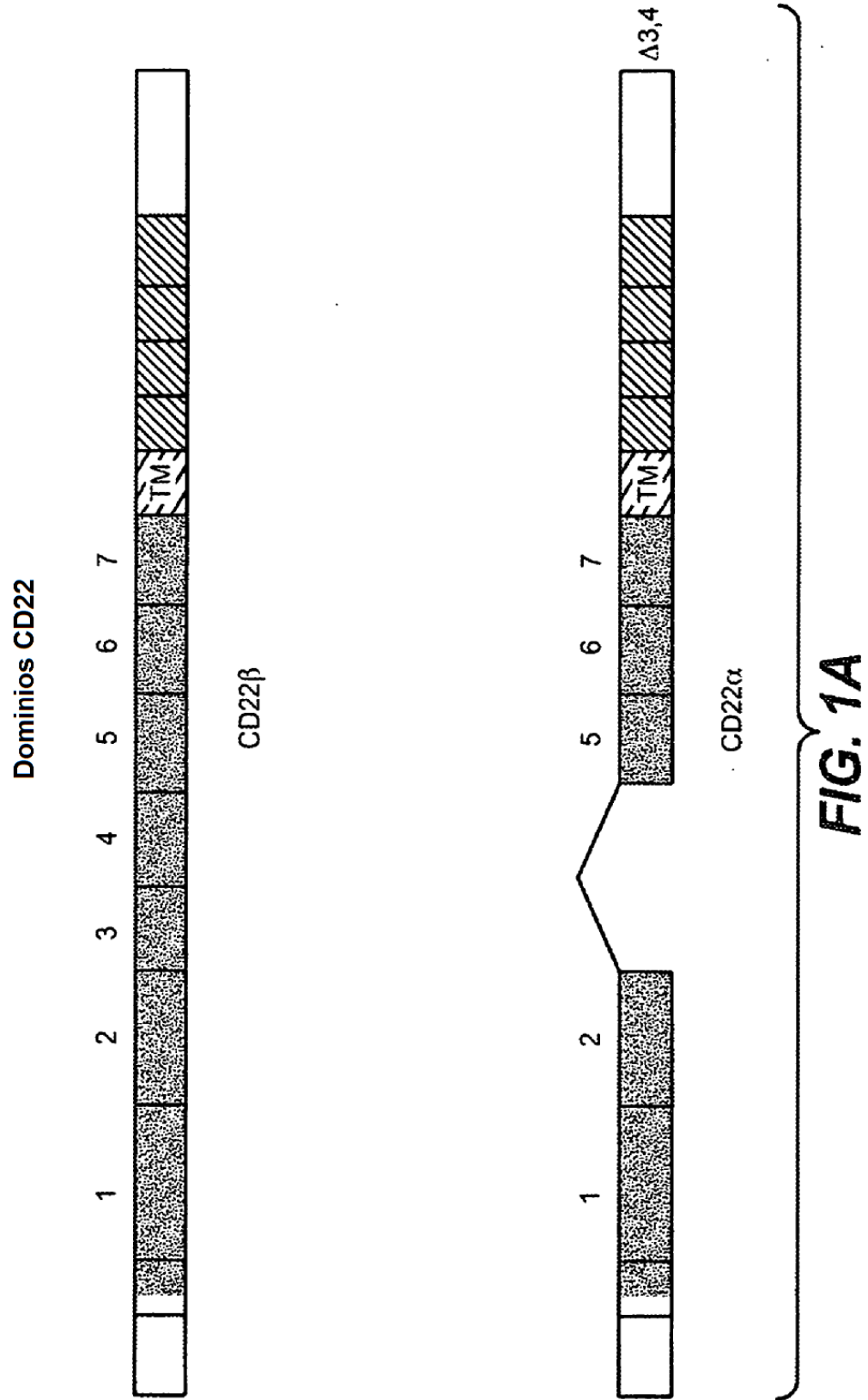
18. El immunoconjugado de la reivindicación 16, en el que:

- 25 (i) L se selecciona de *N*-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), *N*-succinimidil 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC) y *N*-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB);
 (ii) el enlazador está unido al anticuerpo mediante un grupo tiol en el anticuerpo;
 (iii) el enlazador comprende un SPP;
 (iv) el enlazador comprende SMCC; o
 30 (v) p es de 2-4 o de 3-4.

19. Una composición farmacéutica que comprende el immunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19 para uso en un método para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B.

40 21. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, para el uso de la reivindicación 20, en donde el trastorno proliferativo de linfocitos B se selecciona de linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia por tricoleucitos (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.



1 mhlilgplwlll lvleylaifsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlit clinfscyygy piqlqwlleg
 181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
 241 tpkleikvtp sdaivregds vtmtcevsss npeyttvswl kdgtslkkqn tftlnirevt
 301 kdqsgkyccq vsndvgpgrs eevflqvqya pepstvgilh spavegsqve flcmslanpi
 361 ptnytwyhng kemqgrteek vhipkilpwh agtyscvaen ilgtgqrgpg aeldvqyppk
 421 kvttviqnpm piregdtvtl scnyssnps vtryewkphg aweepsigvl kiqnvqwdnt
 481 tiacarcnsw cswaspvaln vqyaprdvrv rkikplseih sgnsvslqcd fssshpkevg
 541 ffwekngrll gkesqlnfds ispedagsys cwnnsigqt askawtlevl yaprrlrsvm
 601 spgdqvmegk satltcesda nppvshytwf dwannqslphh sqklrlepvk vqhsqaywcq
 661 gtmsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgscilail laicgiklqr rwrkrtqsgg
 721 lqenssgqsf fvrnkvrira plsegphslg cynpmmedgi syttlrpfem niprtgdaes
 781 semqrprtc ddtvtysalh krqvgdyenv ipdfpedegi hyseliqfgv gerpqaqenv
 841 dyvilkh (SEC ID N°: 27)

FIG. 1B

1 mhlilgplwlll lvleylaifsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlit clinfscyygy piqlqwlleg
 181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
 241 ppkkvttviq npmpiregdt vtlsnynss npsvtryewk phgaweepsl gvlkiqnvqw
 301 dnttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vrvrkikpls eihsngsvsl qcdfssshpk
 361 evqffweknq rllgkesqln fdispedag syscwnnsi gqtaskawtl evlyaprrlr
 421 vsmspgdqvm egksatltce sdanppvshy twfdwnnqsl pyhsqklrle pvkvqhsqay
 481 wcqgtnsvgk grspistltv yyspetigrr vavglgscia ililaicgik lqrrwrkrtq
 541 qqglqenssg qsfvvrnkvr rraplsegph slgcynpmme dgisyttlrpf pemniprtgd
 601 aessemqrpp pdcddvtys alhkrqvgtm rtsfqifqkm rgfitqs (SEC ID N°: 29)

FIG. 1C

MHLILGPWLLLEYLAFSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACIWPCTYRVLDGA
 LETFILFHNPEYNQNMSEKFEGRTRYESTKDGKVPSPGQKRVQFLGNKINNNC
 TLSIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKWMERIHNLNVSERPFPRIQLPPKLQE
 SQEVTLTCLLNFSYGYQIQLOWLLEGAPMRQAAVTLSLSTKSVFTRSEL
 KFSPQWSSHGKIVTCELHDVDGKVLSEDTVQLNVKHTPKLTIEVTPNETIV
 RKGDSVTMTCKVNSSNPEYTTVSWLKDDIPLKEQNTLMLTLHEVTKSQTGT
 YCCRVSNVDVGPATSEKVFLOVQYAPEPSRVQISQSPAVEGSEVNFLCISPA
 NPLPTNYTWYHNGKEVQGRTEKQFQIQKILPWHAGTYSCVAENILGIGERG
 PGTELDVQYPPKKVTMVIENPTPIREGDTVTLSCNYSNNPIVNHYEWRPR
 GAWEEPSLGVVKIQNIGWNNTAVACAACNNWCSWASPVTNLNVLYAPRGVRV
 RKIKPLSEIHSGNLVSLQCDFFSSHPKEVQFFWEKNGSLLGKESQLNFDSI
 SPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLAPRRLRVSMSSQGNQVMGKTA
 ILTCESDANPPVYSYAWFDWNNQSLPYSGRMLRLEPVKVQHSQAYWCQGTN
 RVGKGHSPLITLTVYYSPEITIGRRVAVGLGSCILAILAMCGFKVQRRWKR
 TQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRTPLESEPHSLGCYNPMMEDGISYATL
 RFPETNTPRTGDAETSELQRLPPDCDDTVTYSVLQKRQVGDYENVIPDFPE
 DEGIHYSELIQFGGERPQAQENVVDYVIVKH (SEC ID N°: 31)

FIG. 1D

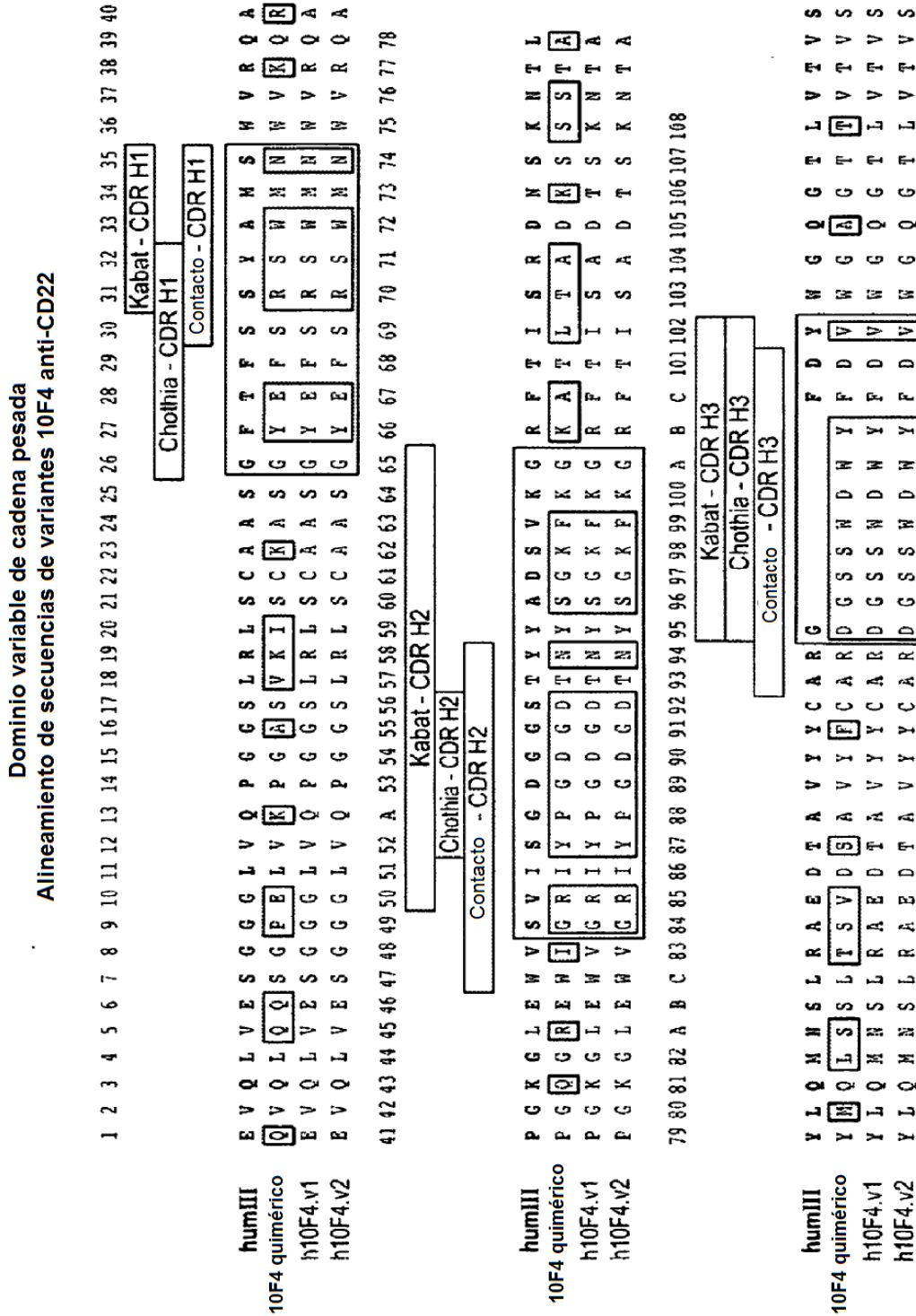


FIG. 2A

Alineamiento de secuencias de variantes 10F4 anti-CD22

F Q G S Q F P Y T F G Q G T K V E I X SEC ID N°: 18

FIG. 2B

I	A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	RVTTIT
	B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTTIT
	C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTTIT
	D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTTIT
II	A	QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSTLTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	RVTTIS
	B	QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTTIS
	C	QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTTIS
	D	QVQLQESGPGGLVKPFSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTTIS
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
Aceptor - 1						
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
Aceptor - 2						
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTTIS

FIG. 3A

I			
A	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
B	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
C	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
D	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
II			
A	VDTSKNQFSLKLSSVT	AADTAVYYCAR	WGQGT
B	VDTSKNQFSLKLSSVT	AADTAVYYCAR	WGQGT
C	VDTSKNQFSLKLSSVT	AADTAVYYCAR	WGQGT
D	VDTSKNQFSLKLSSVT	AADTAVYYCAR	WGQGT
III			
A	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	WGQGT
B	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	WGQGT
C	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	WGQGT
D	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	WGQGT
Aceptor - 1			
A	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
B	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
C	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
Aceptor - 2			
A	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
B	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
C	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT
D	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	WGQGT

FIG. 3B

kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP
kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLI	-L2-	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2	DIVMTQSPISLPVTPGEFASISC	-L1-	WYLQKPGQSPQLLIY	-L2-	GVPDFRFGSGSGTDFTLTKISRVEA
kv3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	-L1-	WYQQKPGQAPRLLIY	-L2-	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC	-L1-	WYQQKPGQPPKLLIY	-L2-	GVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQA

FIG. 4A

kv1	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEC ID N°: 74, 75, 76, 77
kv1	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEC ID N°: 74, 78, 76, 77
kv2	EDVGYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEC ID N°: 49, 79, 80, 77
kv3	EDFAVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEC ID N°: 81, 82, 83, 77
kv4	EDVAVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEC ID N°: 84, 85, 86, 77

FIG. 4B

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV				
	****			*	* *
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
		*	*	*	*
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
			D L		
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	**	*		*	
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSCSVMH				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMH				
	*	*	*	*	* *
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK		SEC ID N°: 38		
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK		SEC ID N°: 39		
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK		SEC ID N°: 40		
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK		SEC ID N°: 41		
	**	*			

Una secuencia consenso de región constante de cadena ligera kappa:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEC ID N°: 37

FIG. 5A

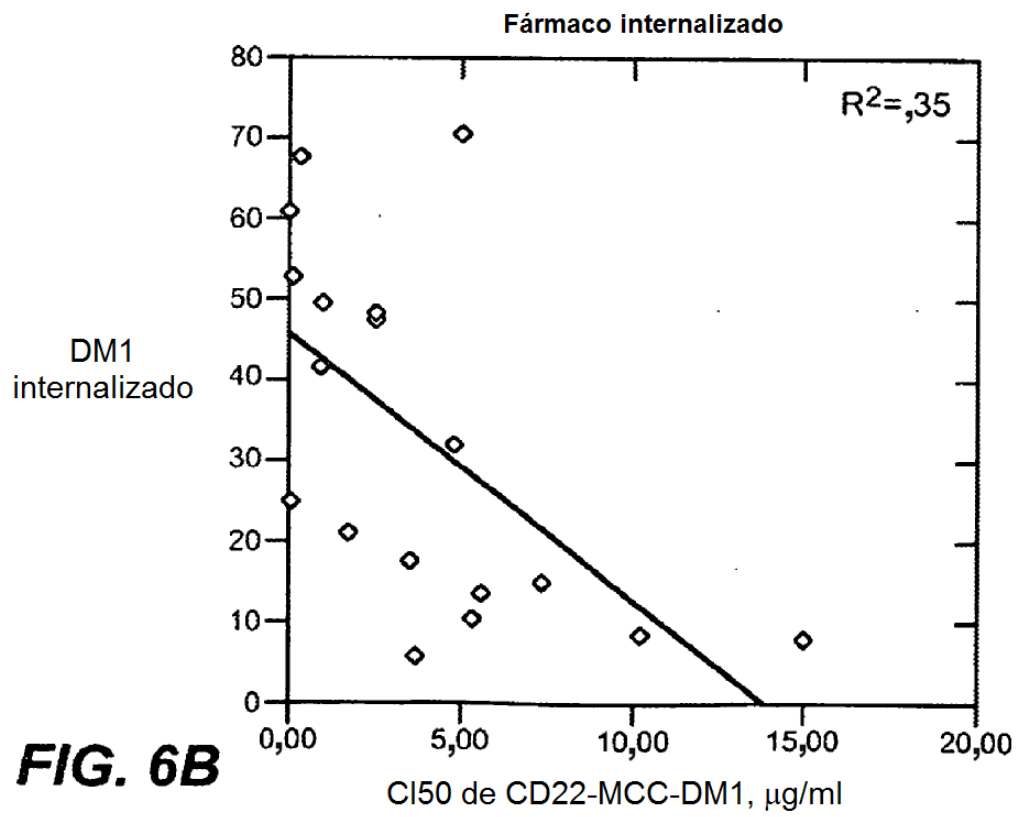
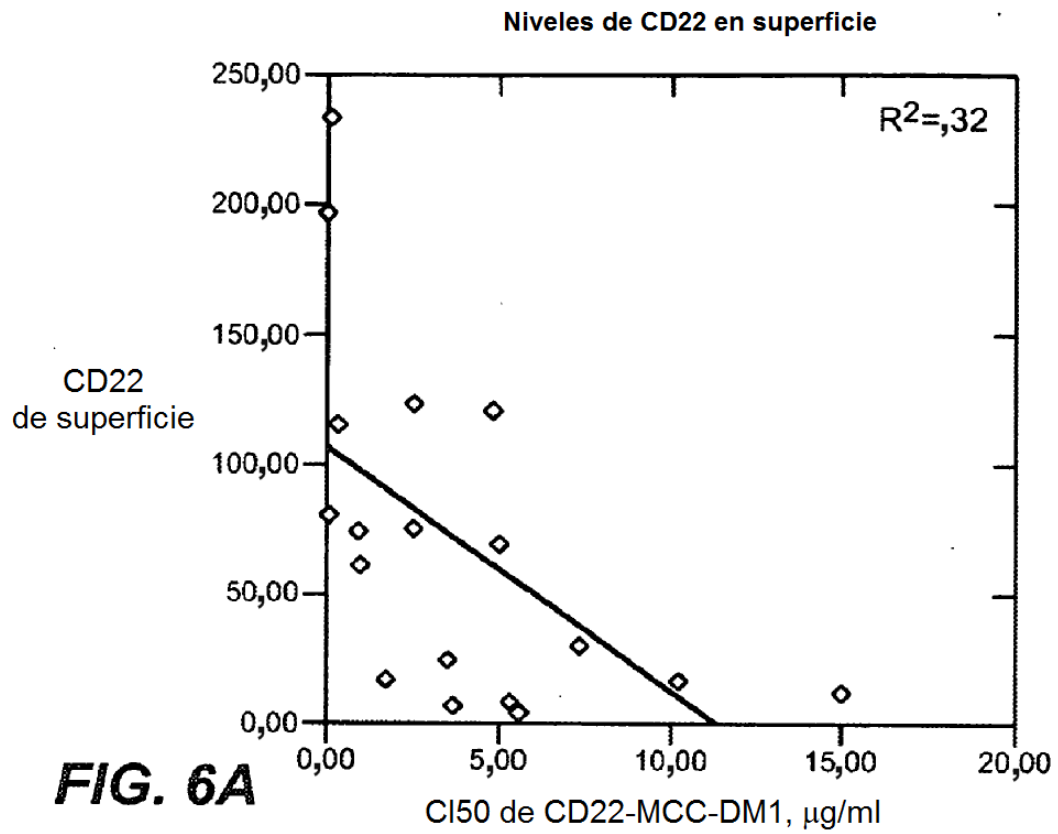
Cadena ligera de h10F4v2 anti-CD22

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSIHVSNGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
OSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEC ID N°: 87)

Cadena pesada de h10F4v2 anti-CD22

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRWNNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSKGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTAIVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN
VFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 88)

FIG. 5B



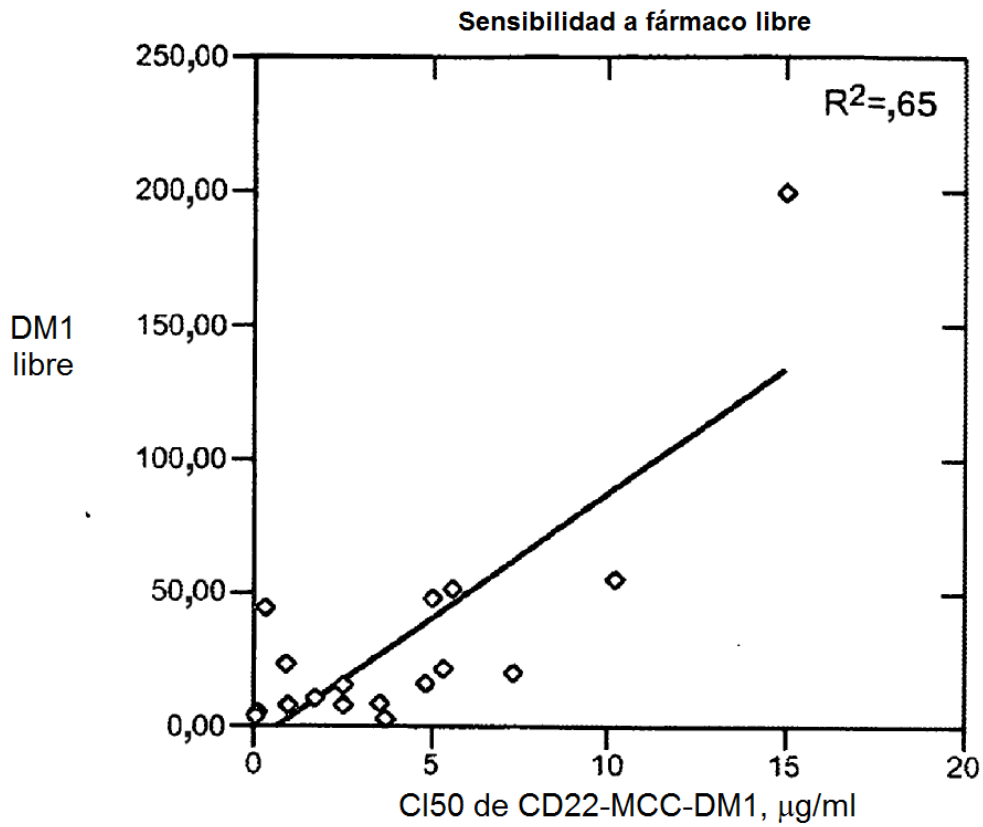


FIG. 6C

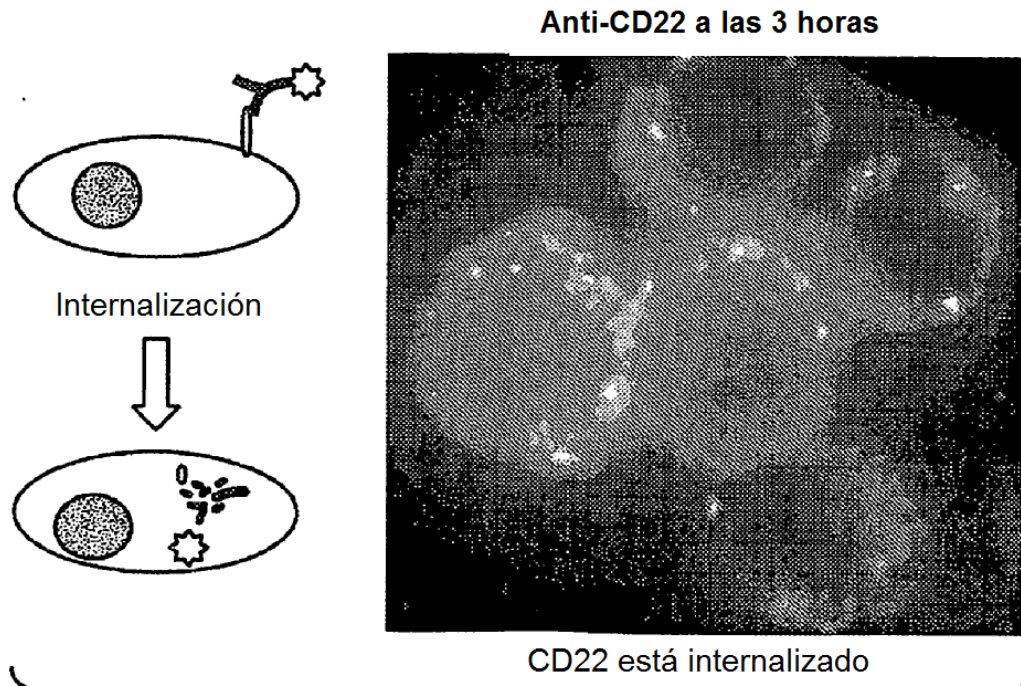
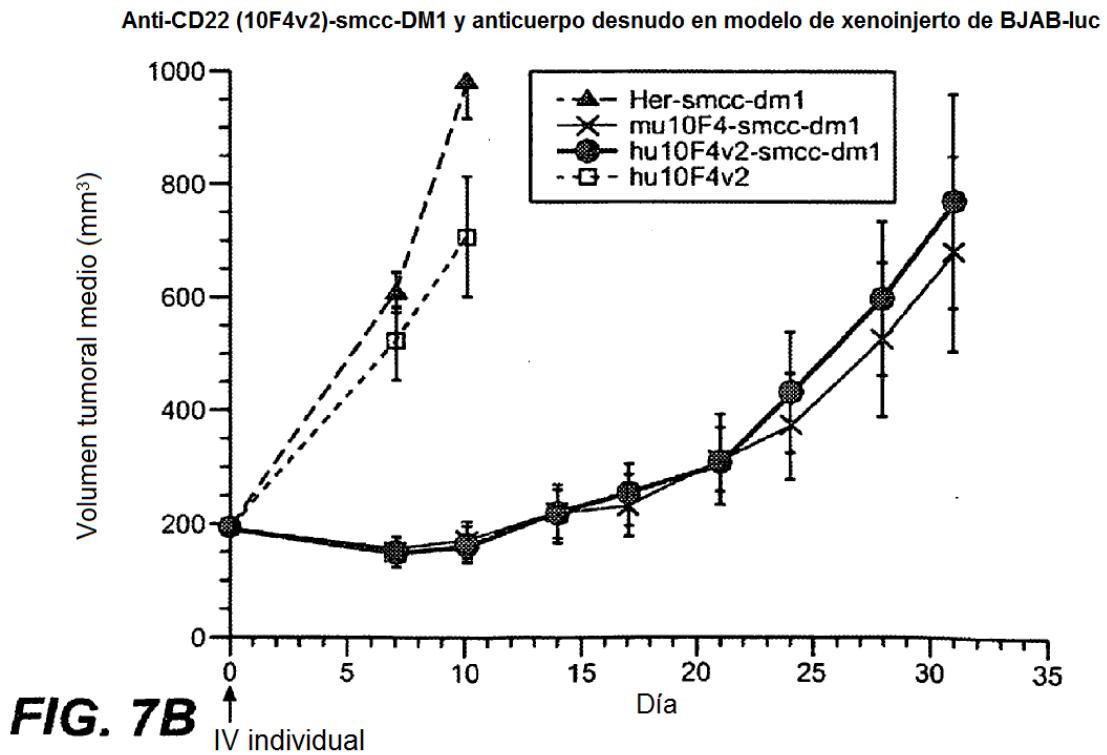
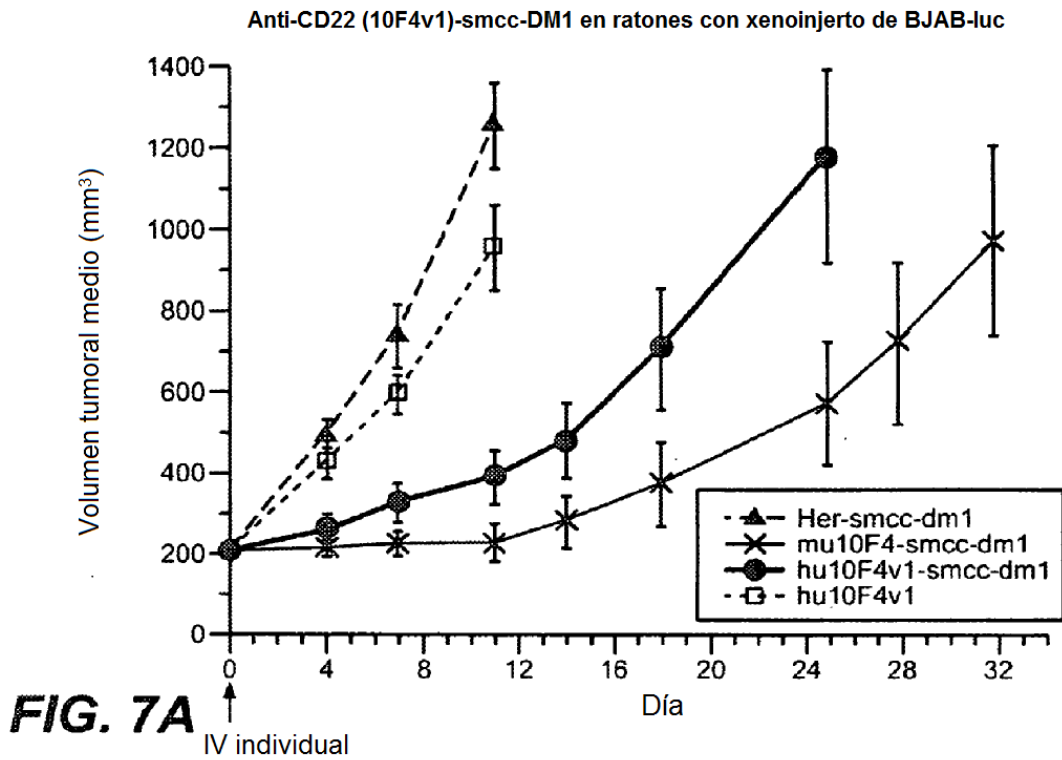
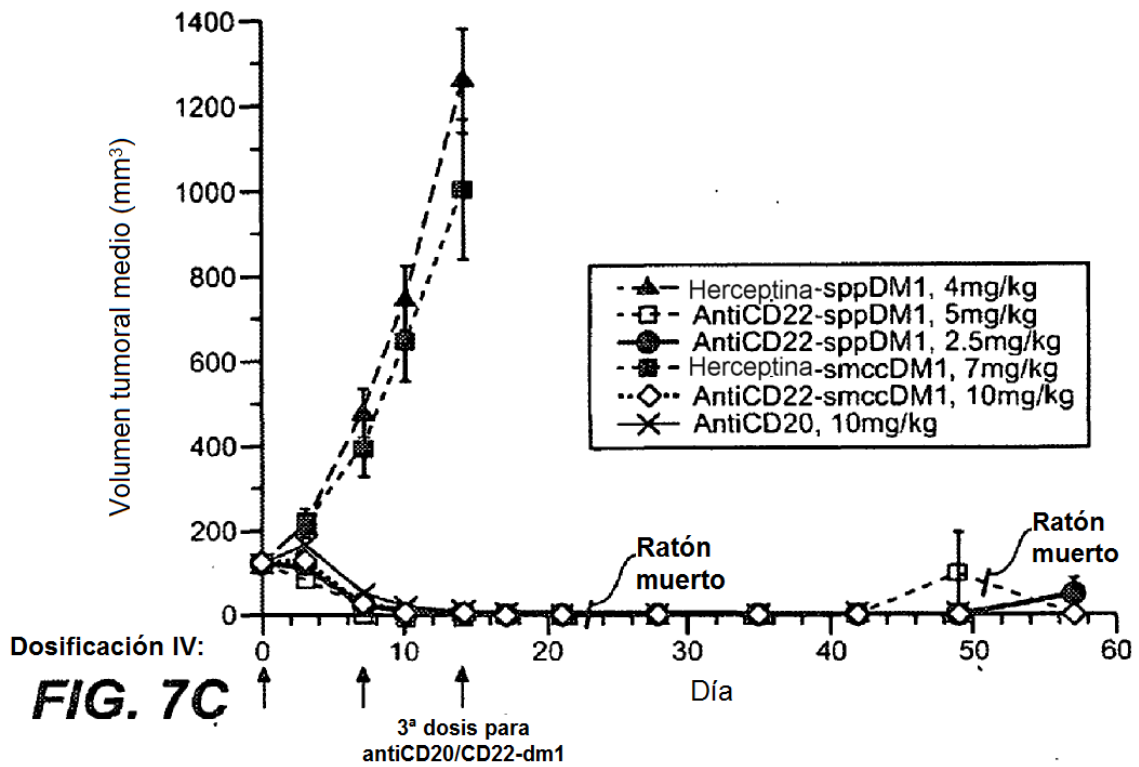


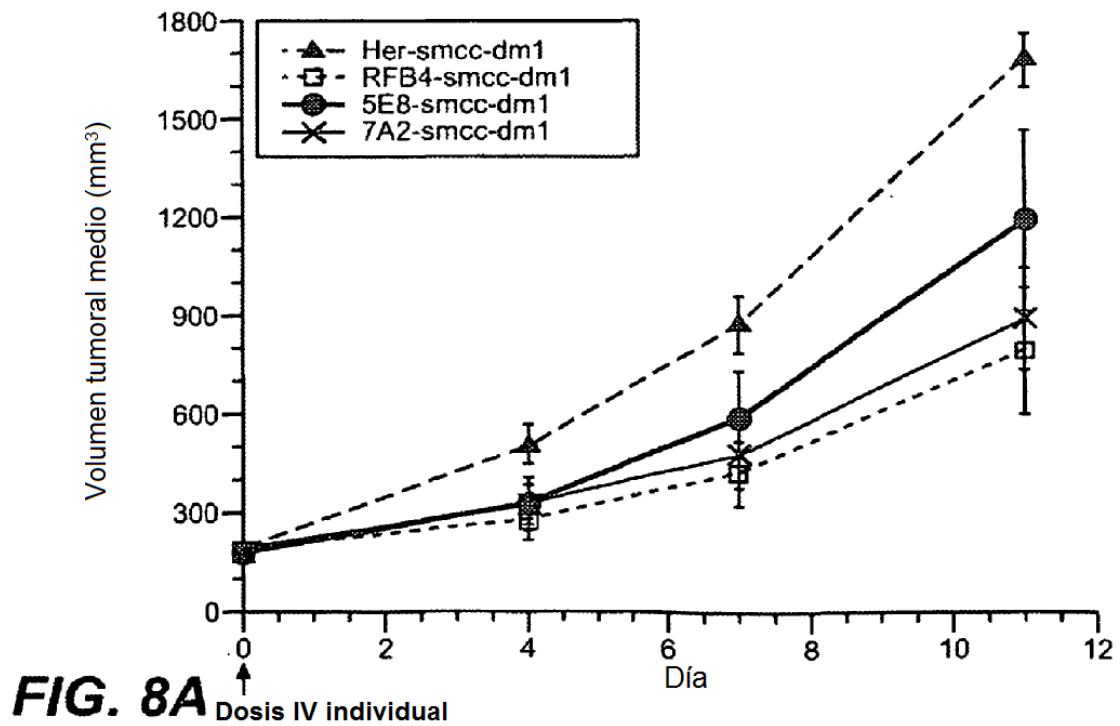
FIG. 6D

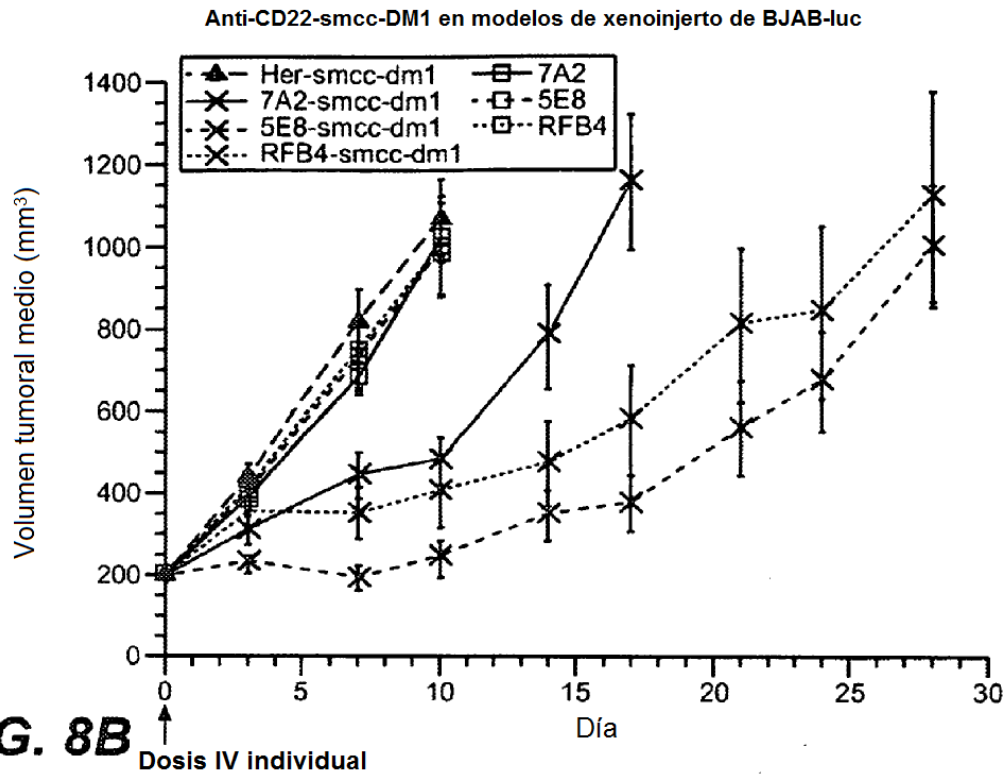


Anti-CD22-spp-DM1 y -smcc-DM1 en modelo de xenoinjerto de BJAB-luc

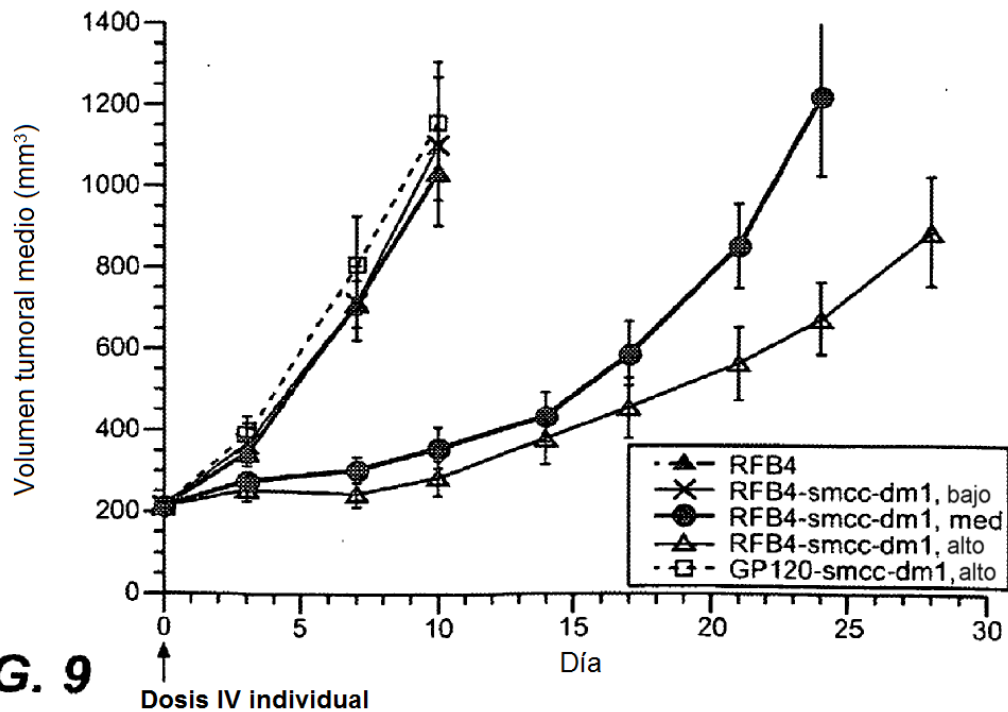


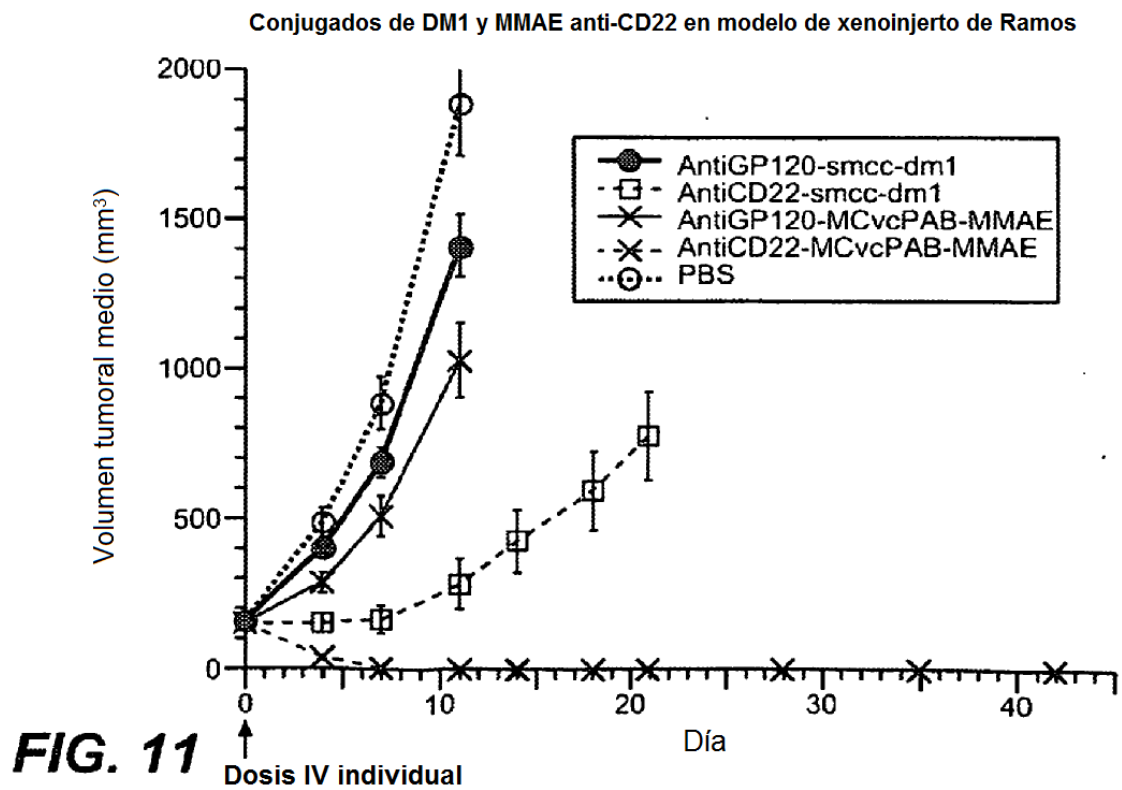
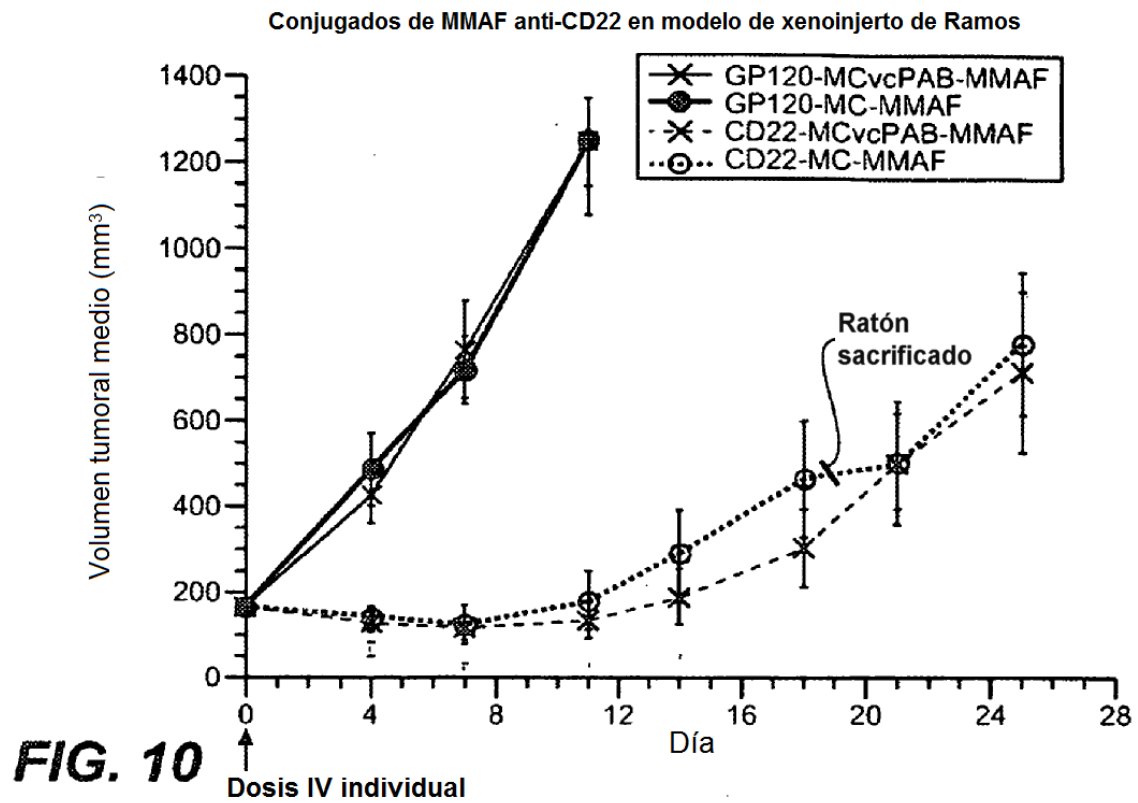
Anti-CD22-smcc-DM1 en modelos de xenoinjerto de Ramos



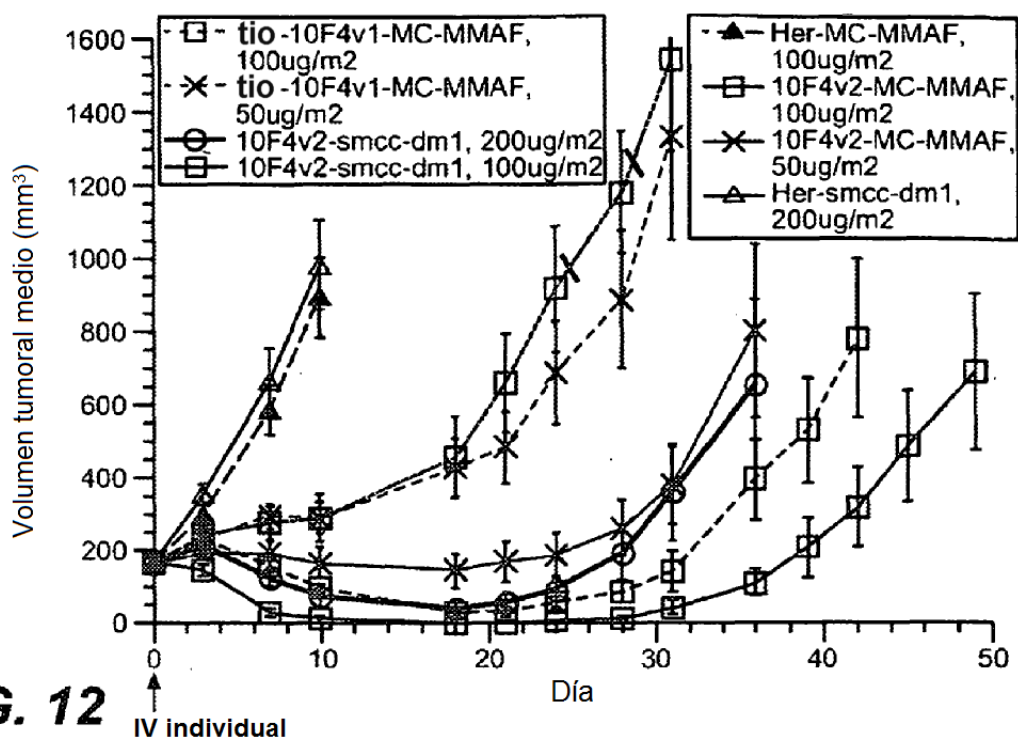


Anti-CD22(RFB4)smcc-DM1, diversas cargas farmacológicas en modelos de xenoinjerto de BJAB-luc



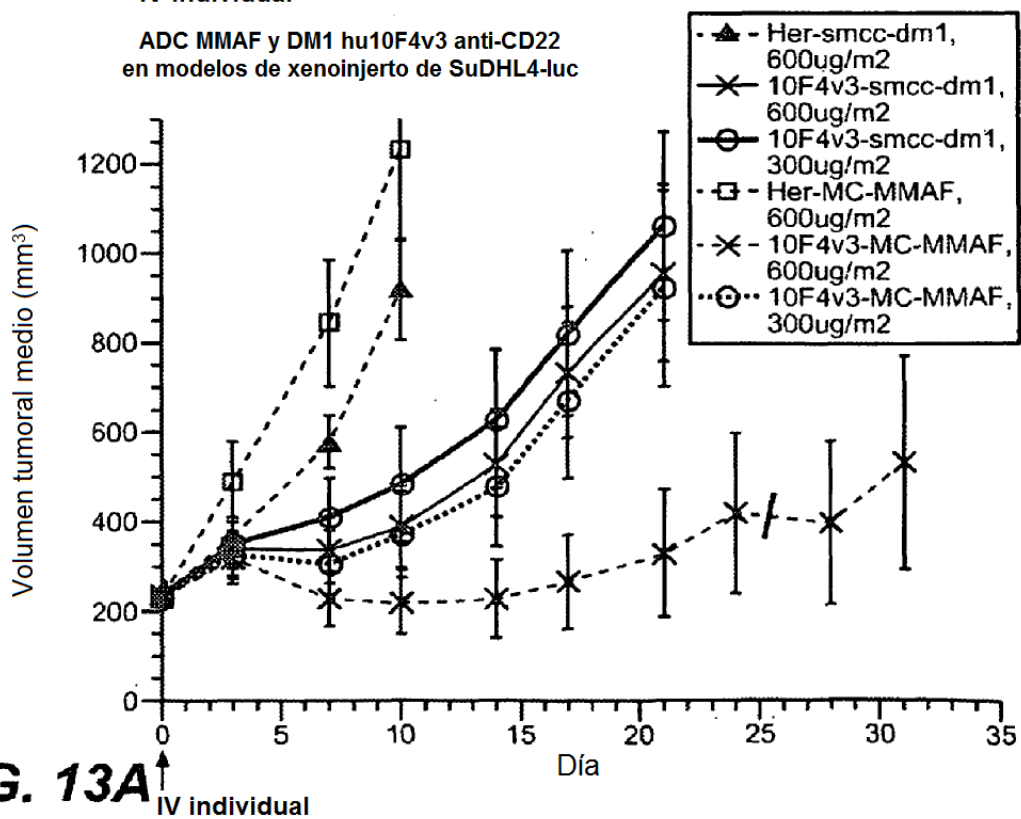


ADC MMAF y DM1 hu10F4 anti-CD22 en modelos de xenoinjerto de BJAB-luc

**FIG. 12**

IV individual

ADC MMAF y DM1 hu10F4v3 anti-CD22 en modelos de xenoinjerto de SuDHL4-luc

**FIG. 13A**

IV individual

ADC MMAF y DM1 hu10F4v3 anti-CD22 en modelos de xenoinjerto de DoHH2

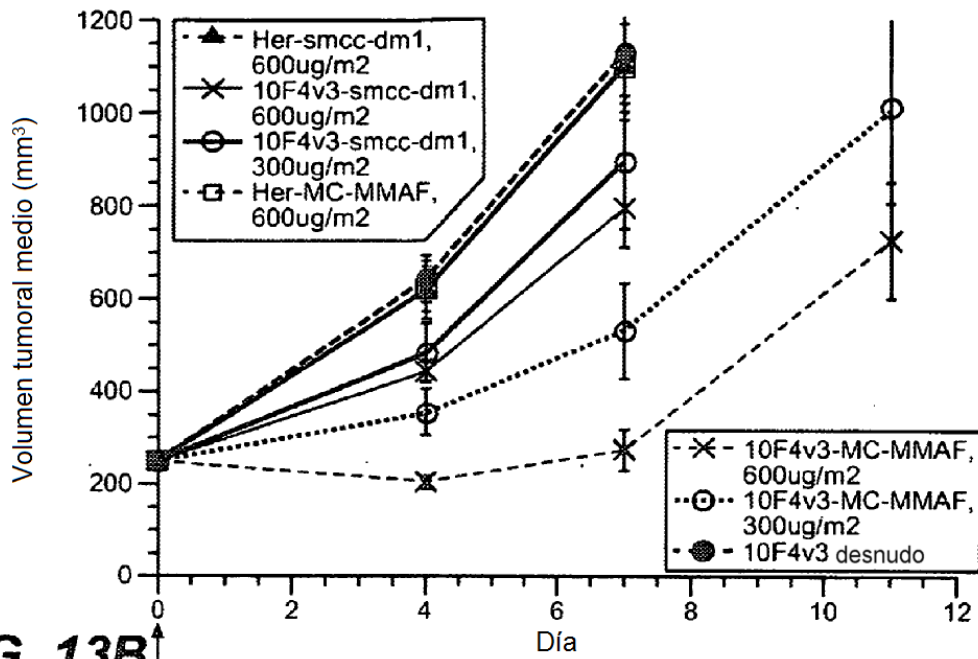


FIG. 13B

ADC MMAF y DM1 hu10F4v3 anti-CD22 en modelos de xenoinjerto de Granta-519

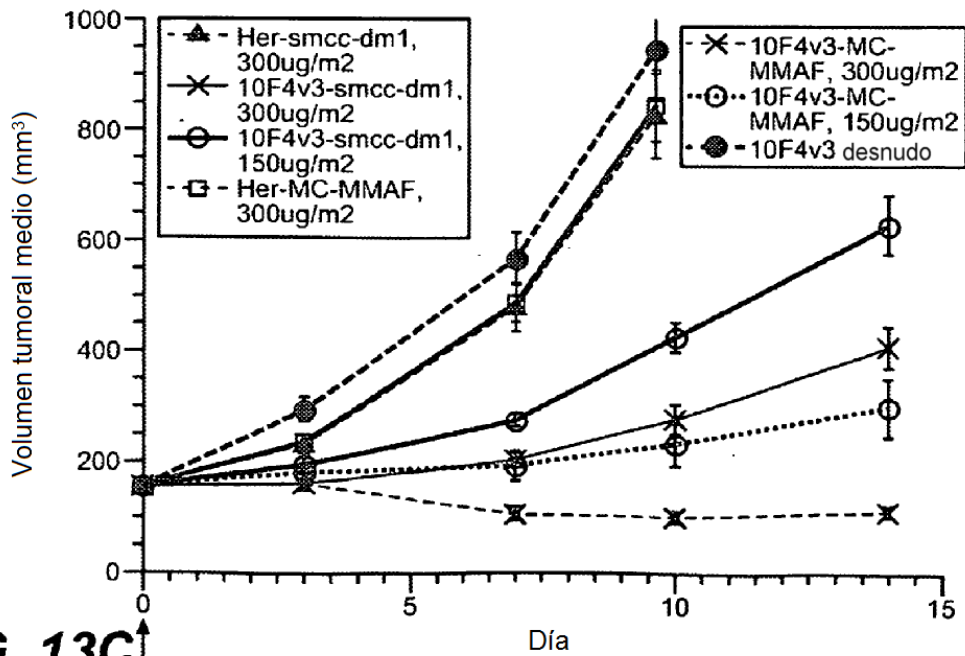
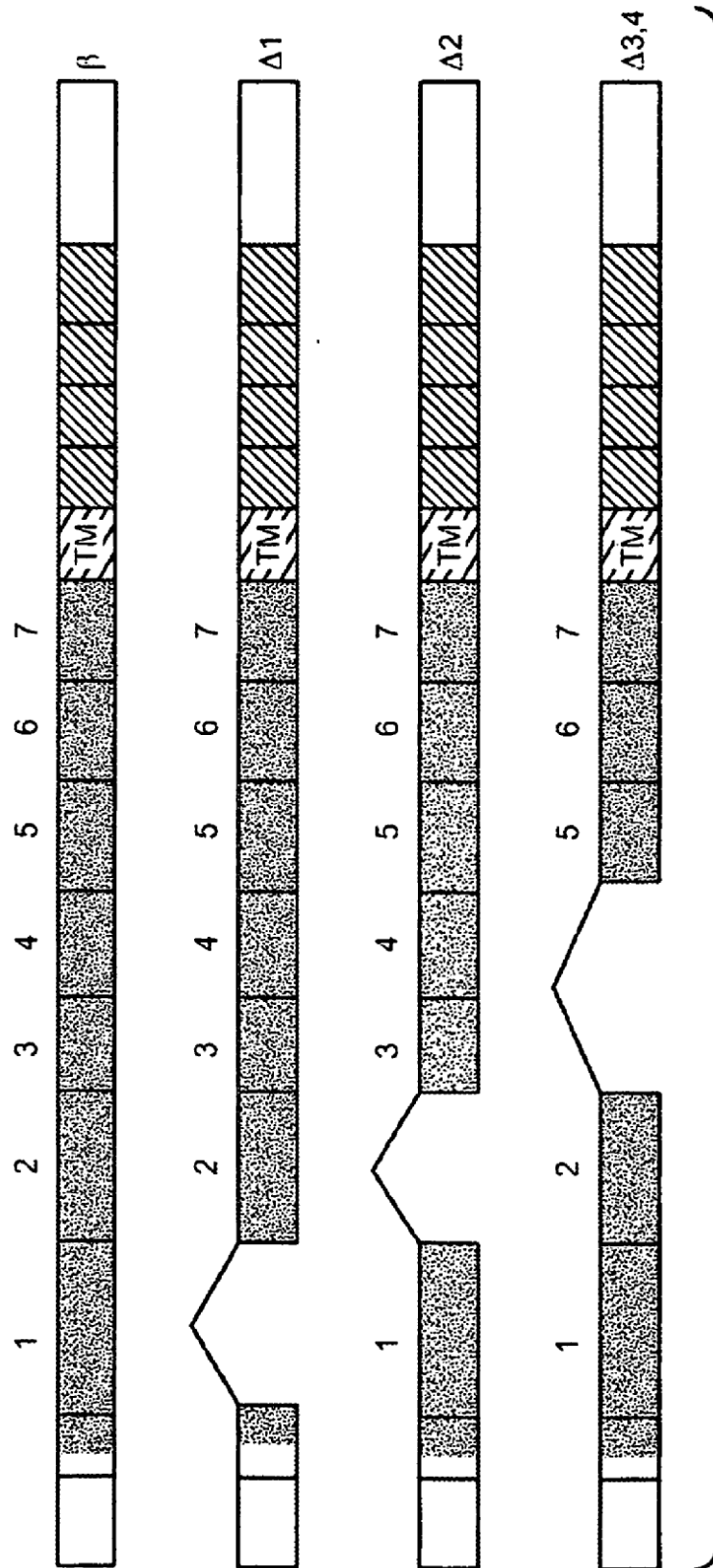
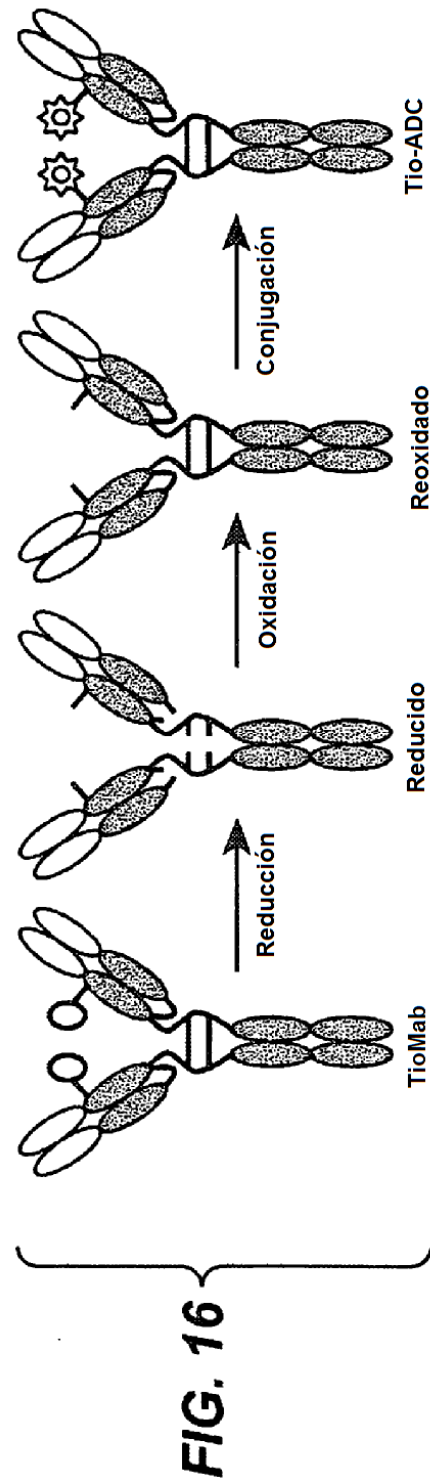
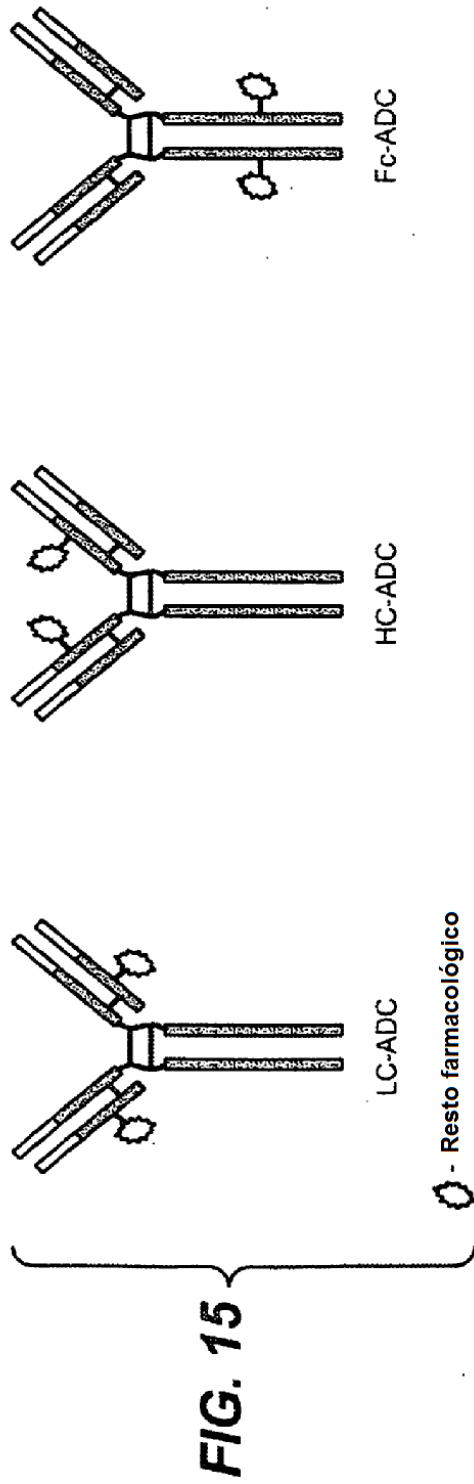


FIG. 13C

Deleciones de dominio CD22 para mapeo de epítomos





Cadena ligera modificada por ingeniería genética con cisteína de h10F4v3 V205C anti-CD22

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSIIVHSGVNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPCTK
SFNRGEC (SEC ID N°: 91)

FIG. 17A

Cadena pesada modificada por ingeniería genética con cisteína de h10F4v3 A118C anti-CD22

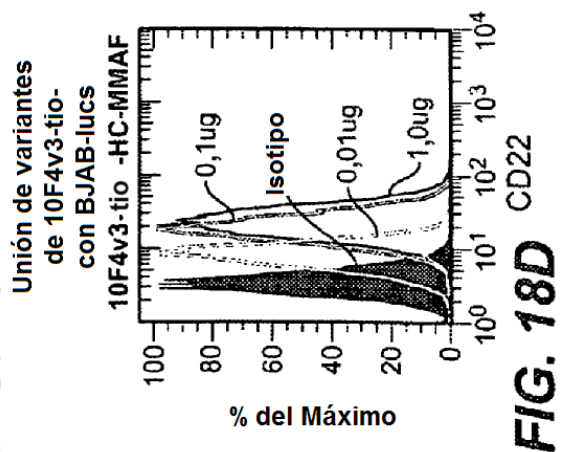
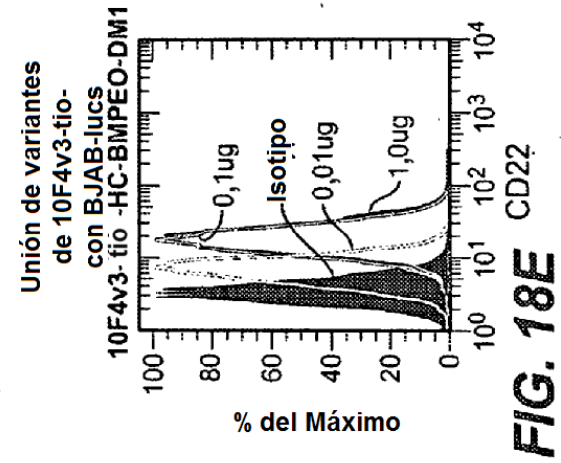
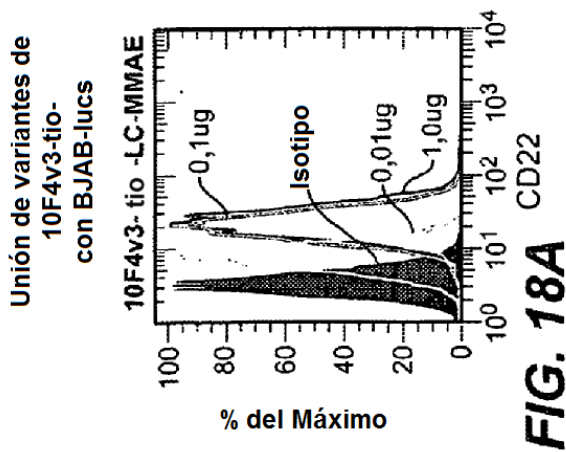
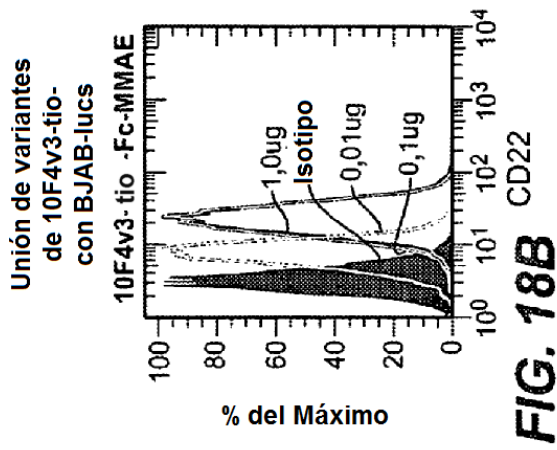
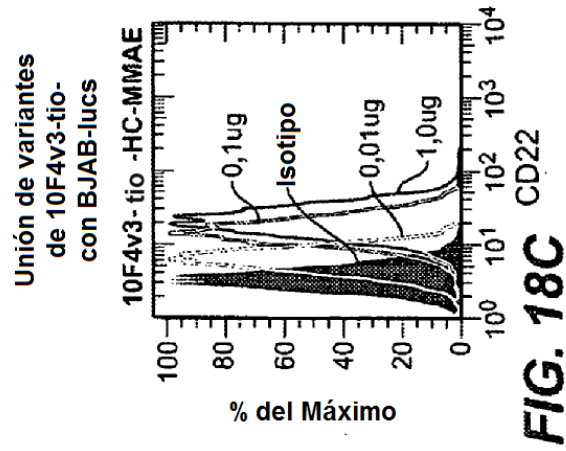
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSKGFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLLTVSSCTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN
GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 92)

FIG. 17B

Región Fc modificada por ingeniería genética con cisteína de h10F4v3 S400C anti-CD22

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSKGFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN
GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 93)

FIG. 17C



Efecto de TDC anti-CD22 administrados a xenoinjerto de Granta-519 en ratones SCID

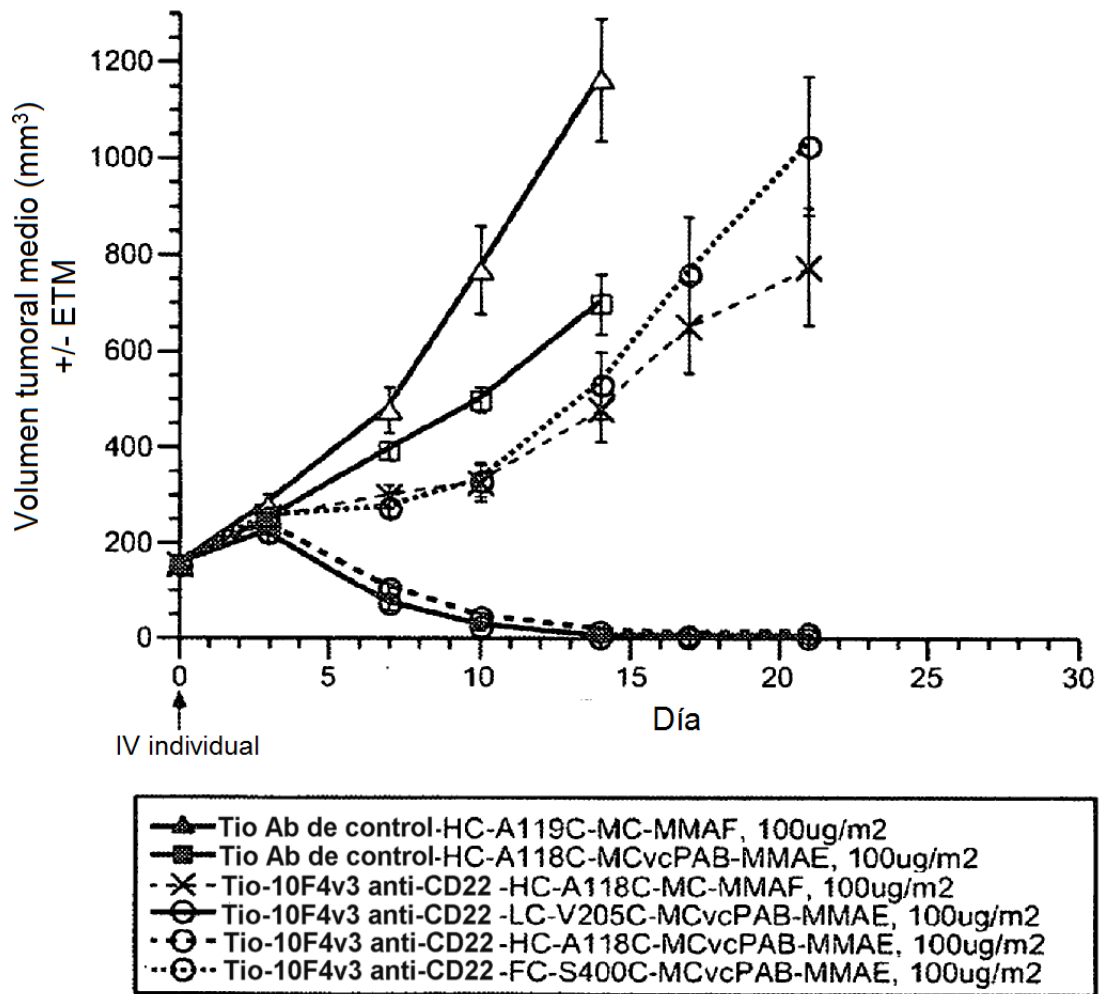


FIG. 19

Tio HC(A118C) 10F4v3 anti-CD22-BMPEO-DM1, -MCvcPAB-MMAE y MC-MMAF frente a xenoinjerto de Granta-519 de linfoma de células del manto humano en ratones SCID CB17

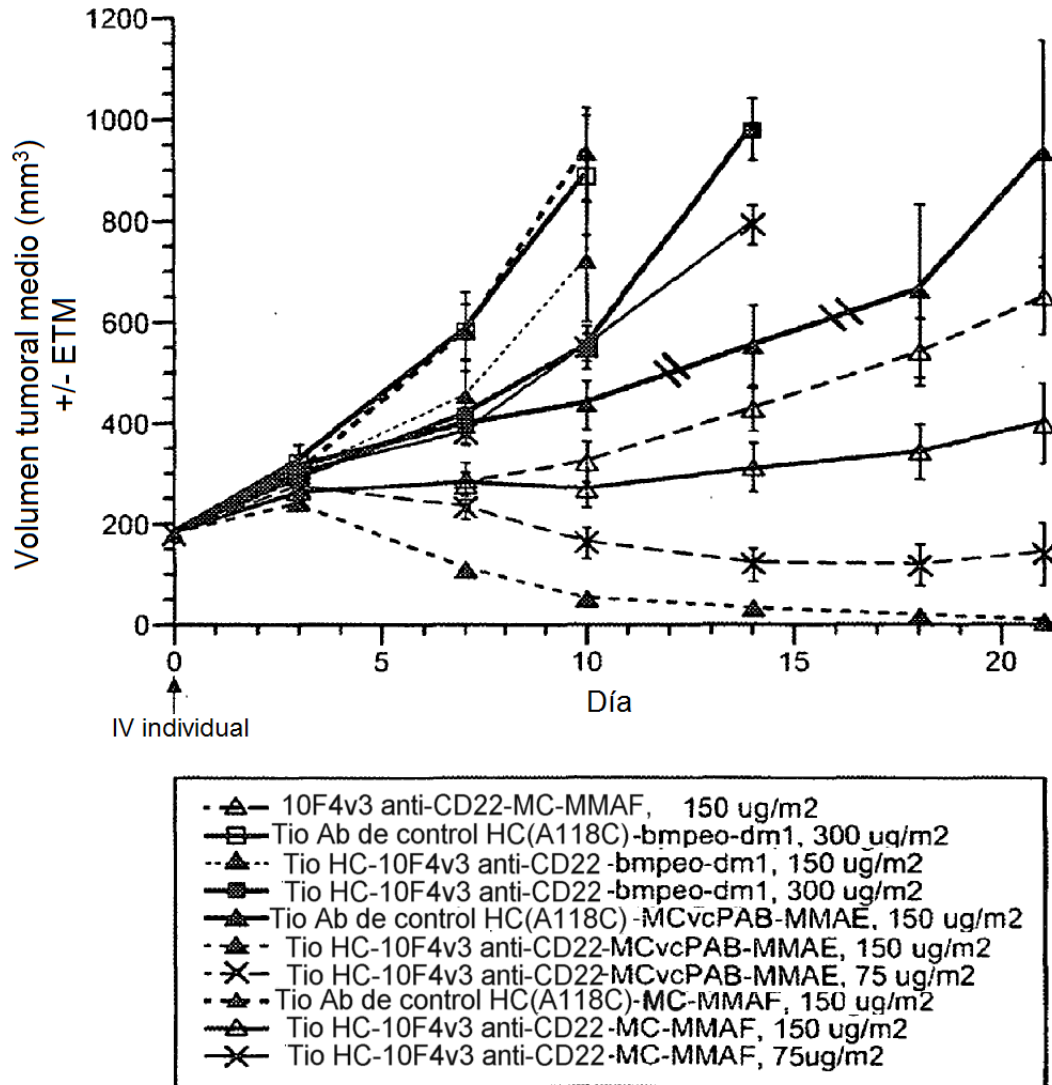


FIG. 20A

Tio HC-A121C-10F4v3 anti-CD22-BMPEO-DM1, -MCvcPAB-MMAE y MC-MMAF frente a un xenoinjerto de DOHH2 de linfoma folicular en ratones SCID CB17

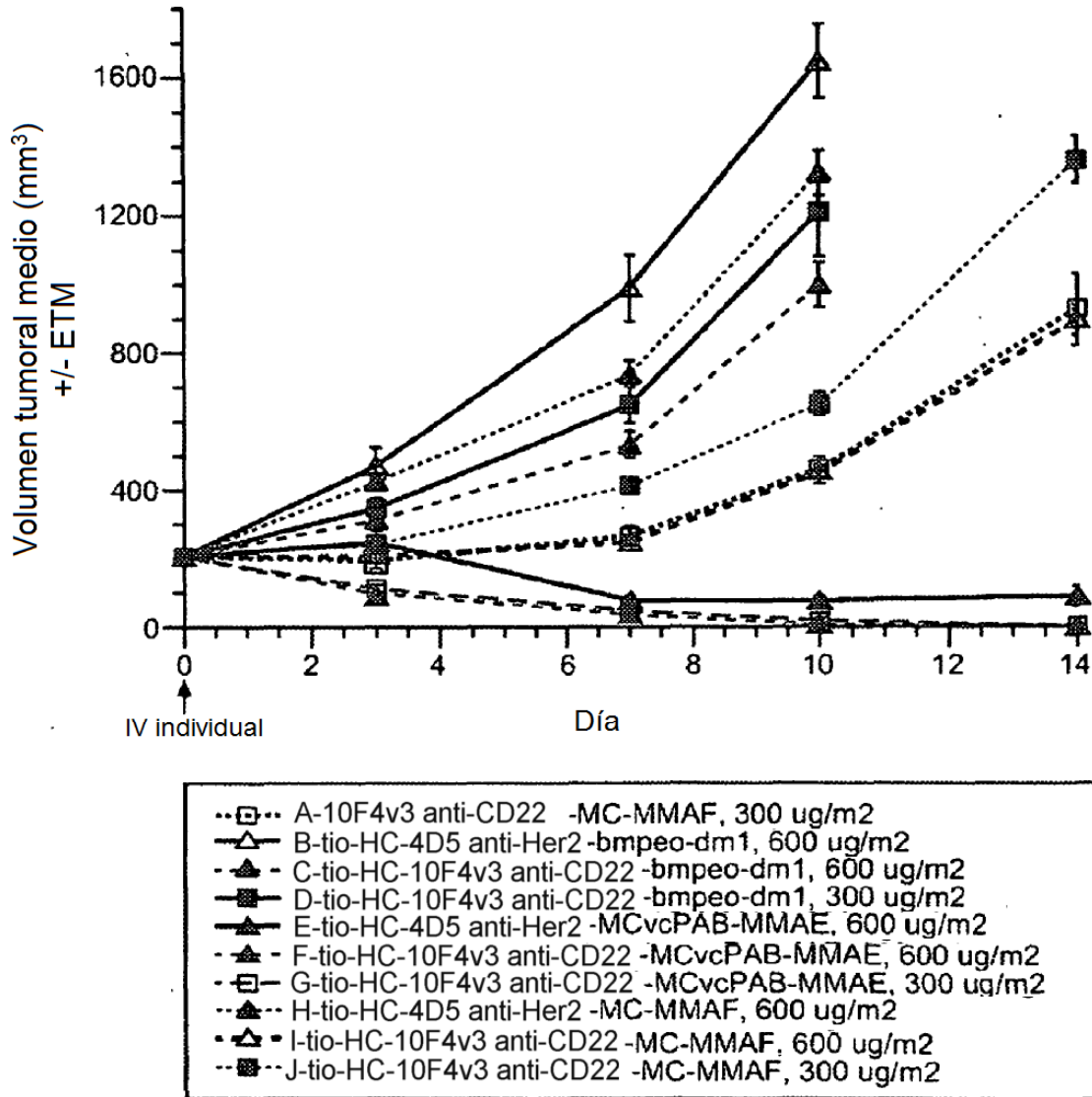


FIG. 20B

Tio HC-A121C-10F4v3 anti-CD22-BMPEO-DM1, -MCvcPAB-MMAE y MC-MMAF frente a un xenoinjerto de DOHH2 de linfoma folicular en ratones SCID CB17

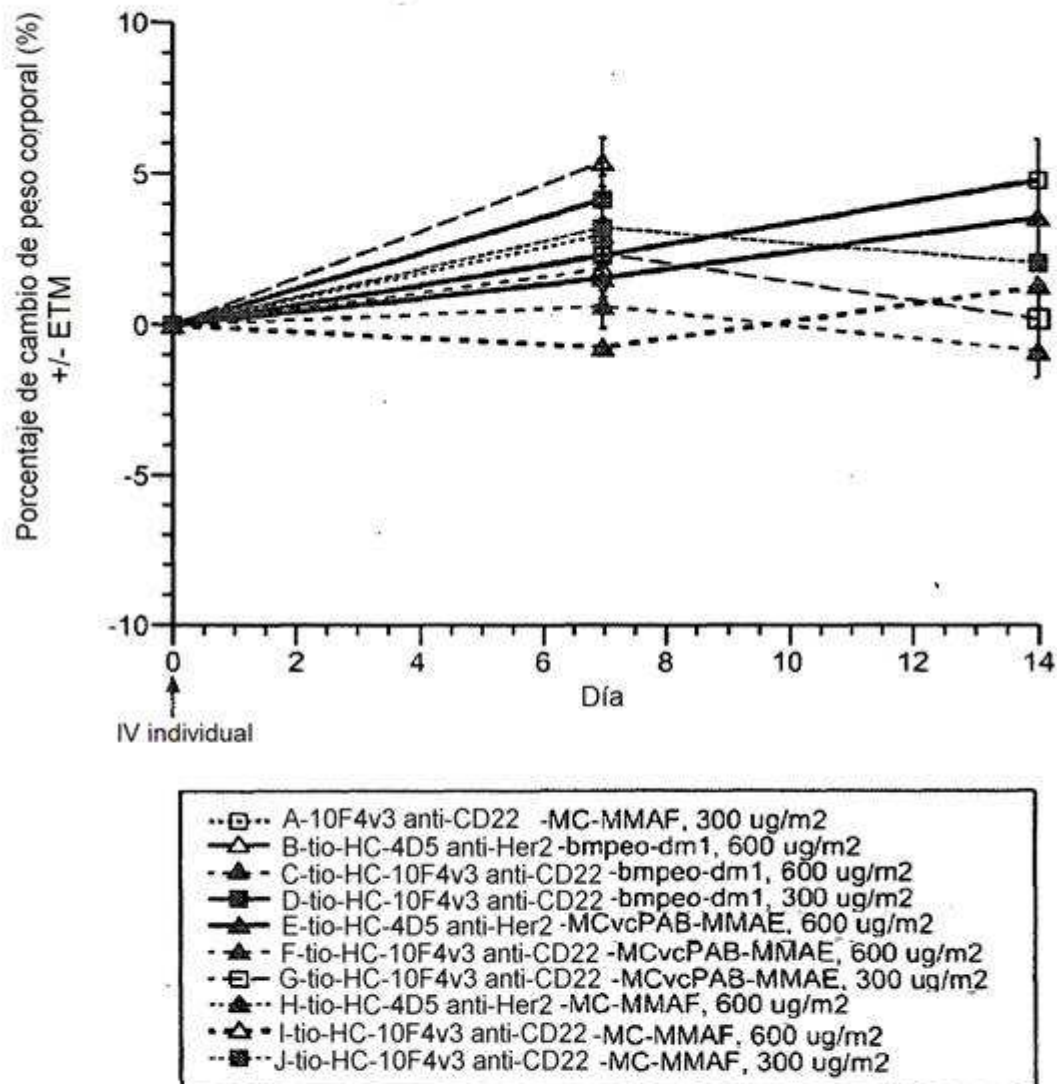


FIG. 20C

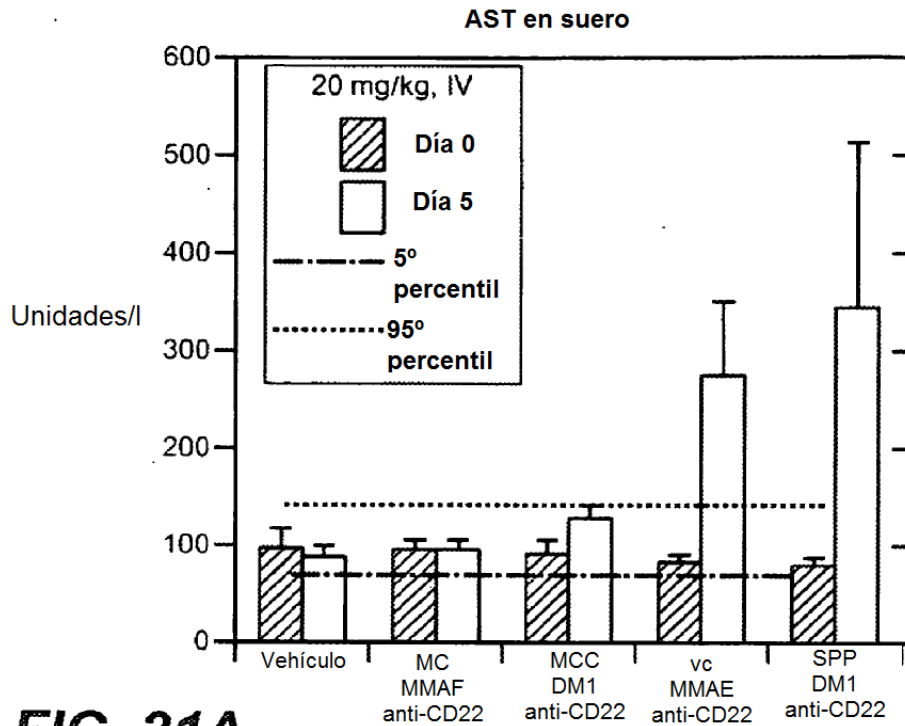


FIG. 21A

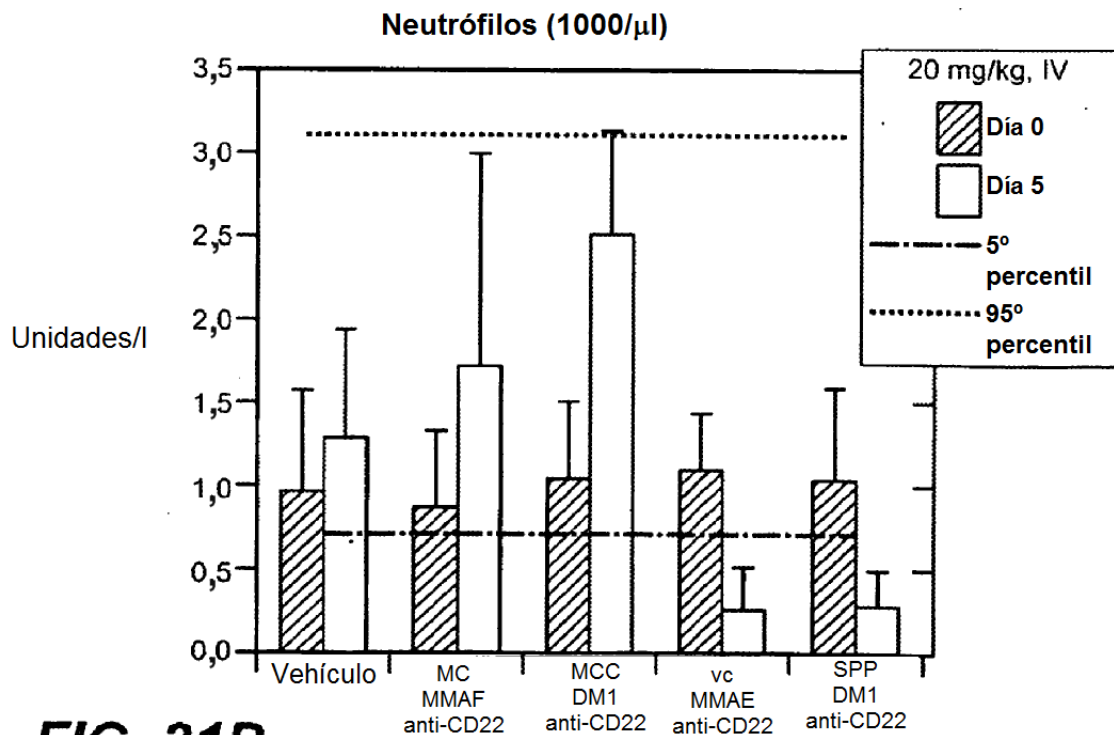


FIG. 21B

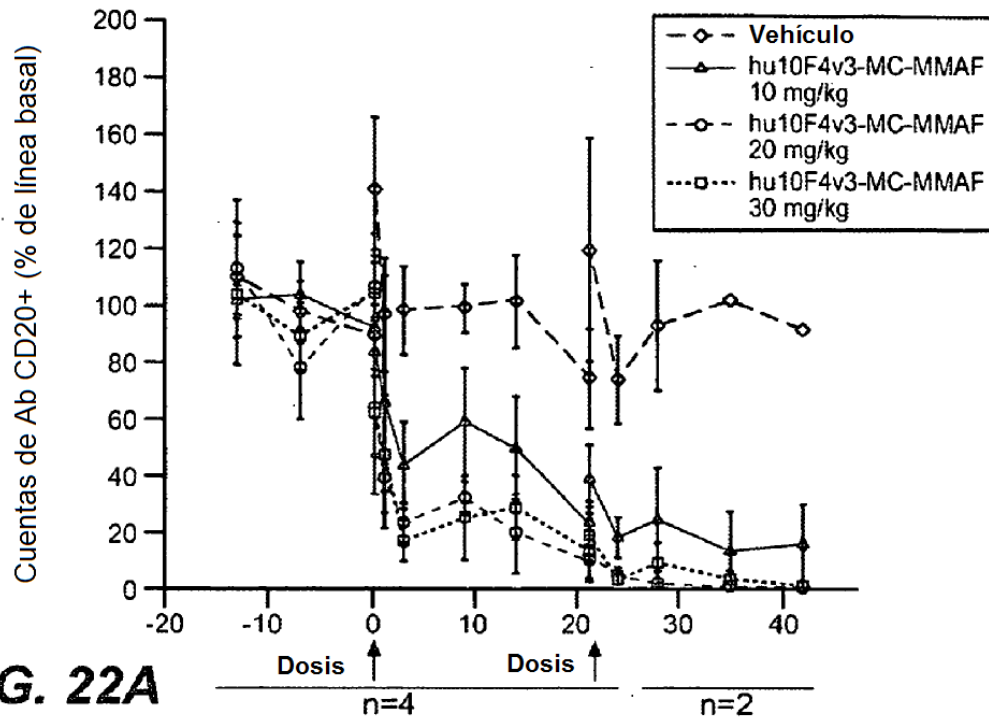


FIG. 22A

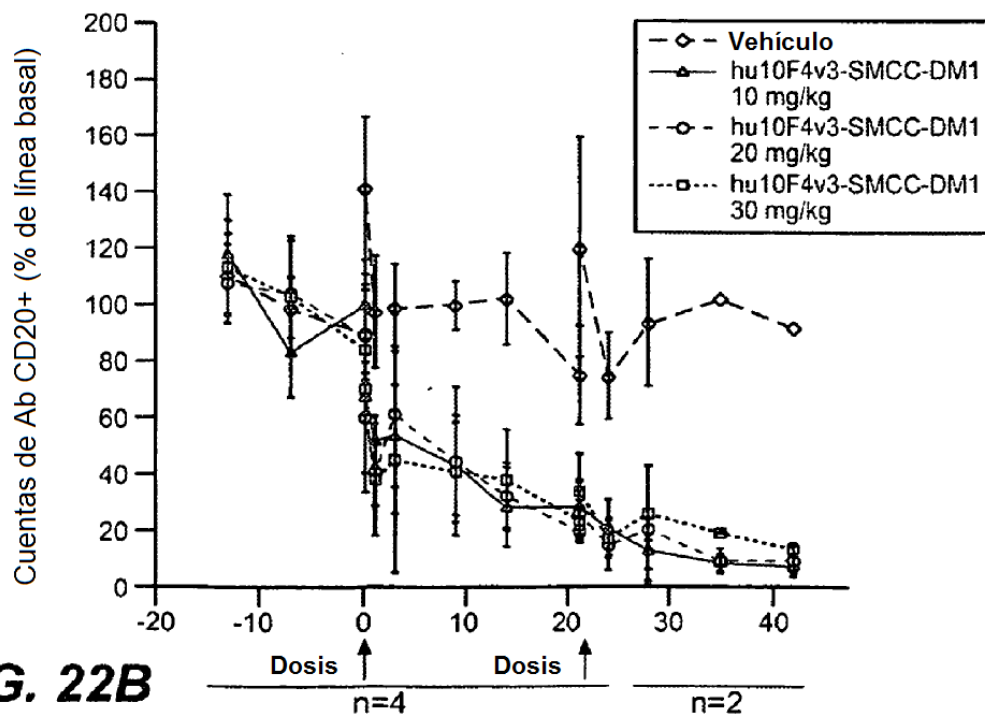


FIG. 22B

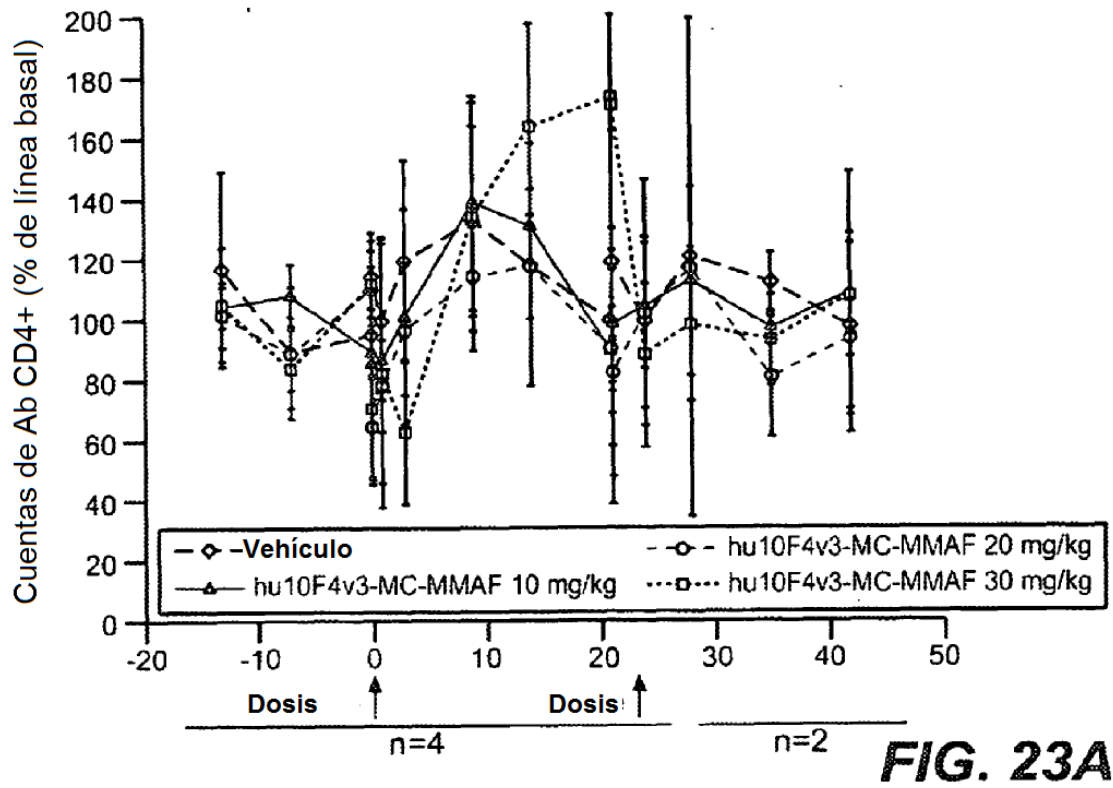


FIG. 23A

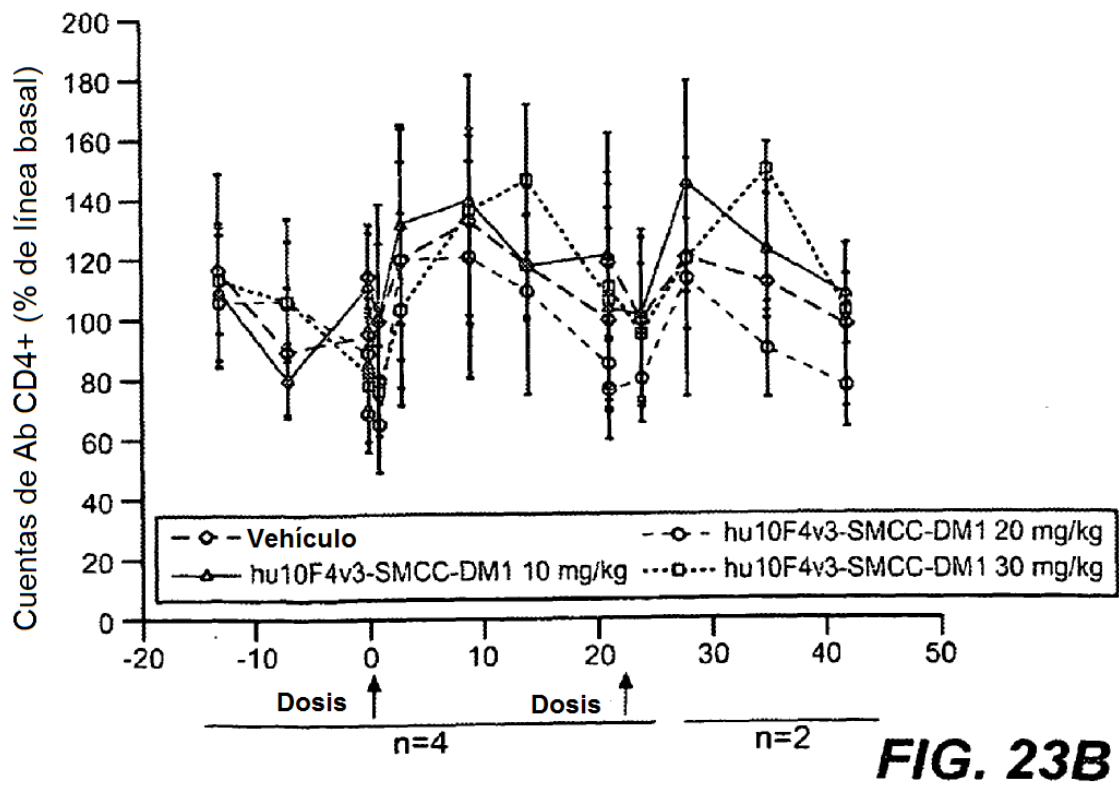


FIG. 23B

Amígdala de control de vehículo

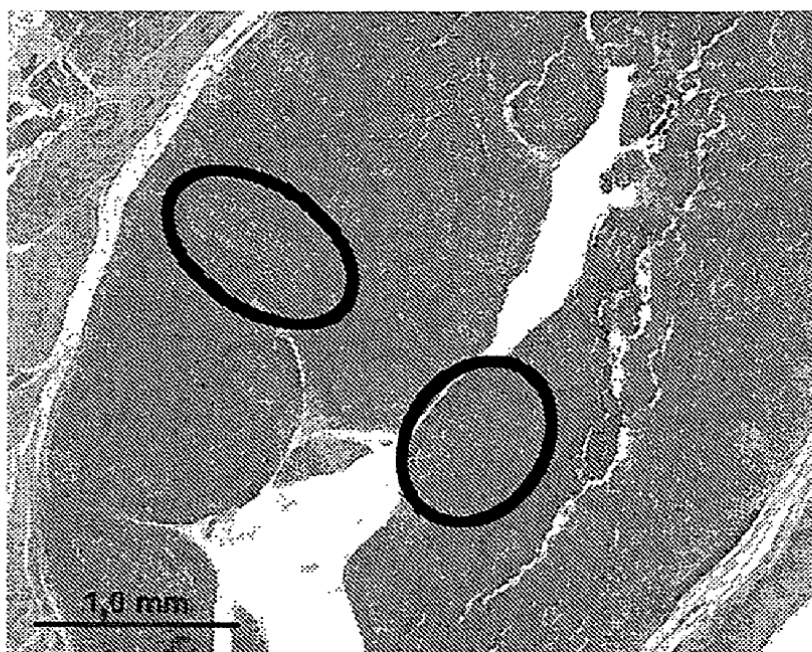


FIG. 24A

Amígdala con hu10F4v3-SMCC-DM1



FIG. 24B

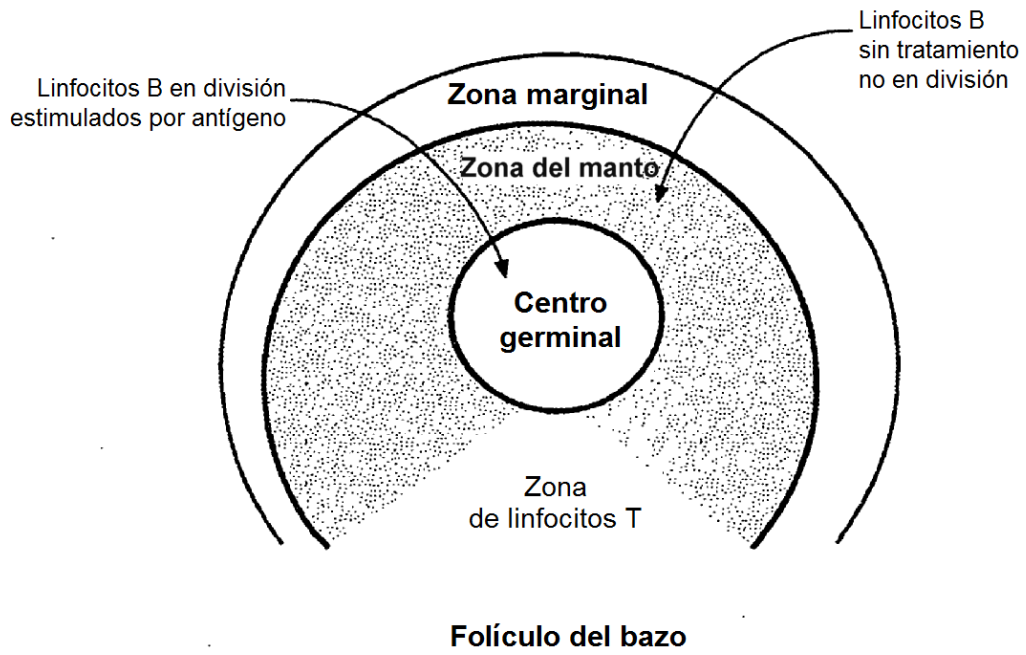
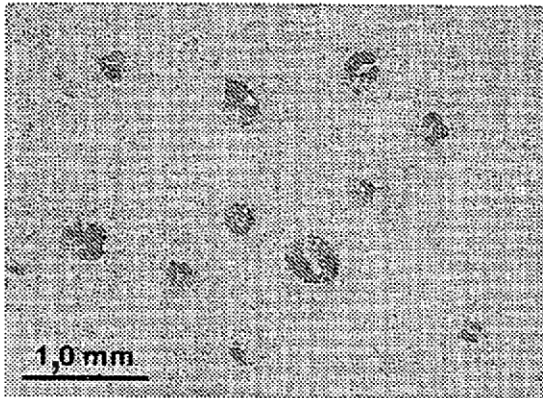


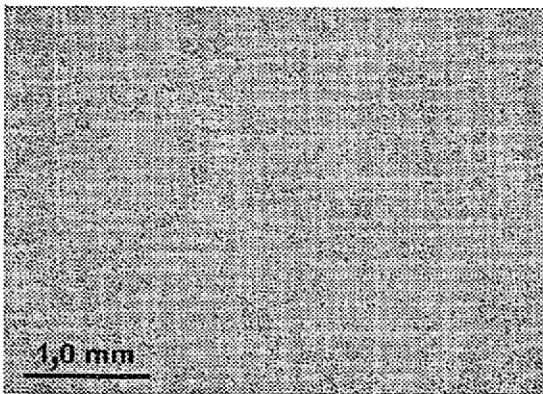
FIG. 25A

FIG. 25B

Tinción con Ki-67
(células en división)



Vehículo

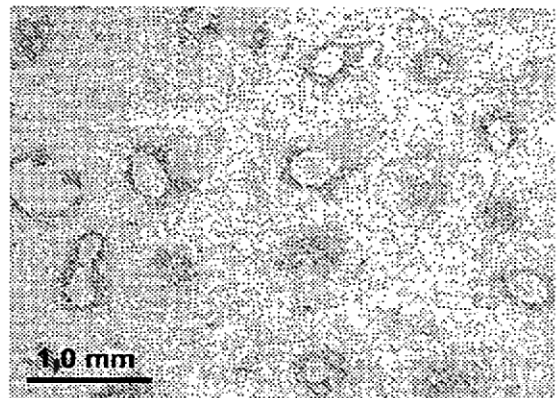


Anti-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

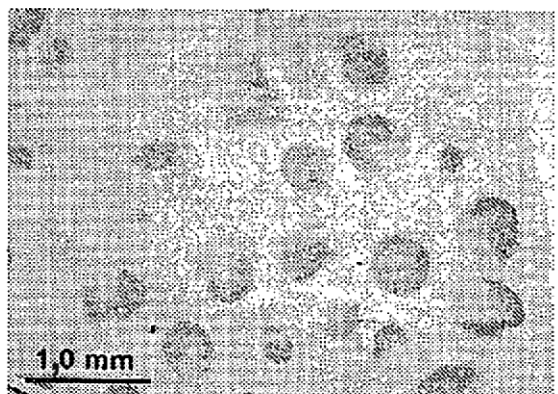
FIG. 25C

FIG. 25D

Tinción con anti-IgD
(linfocitos B sin tratamiento)



Vehículo



Anti-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

FIG. 25E