

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 274**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2015 PCT/US2015/026491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15161267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2015 E 15780369 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3131917**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos para CD99**

30 Prioridad:

18.04.2014 US 201461981681 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**LIU, JIE;
LEVY, RONALD y
MAJETI, RAVINDRA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 811 274 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 monoclonales humanizados y quiméricos para CD99

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 El antígeno CD99 (Agrupación de diferenciación 99) también conocido como MIC2 o glicoproteína tipo 1 de cadena sencilla es una proteína transmembrana fuertemente O-glicosilada que está codificada por el gen de CD99 en humanos. CD99 tiene un papel clave en varios procesos biológicos, incluyendo la adhesión celular, la migración y la apoptosis; diferenciación de células T y timocitos; diapedesis de linfocitos a endotelio vascular inflamado; mantenimiento de la morfología celular; y regulación del tráfico de proteínas de la membrana intracelular.

15 El CD99 se describió originalmente como un antígeno de leucemia tímica humana y se descubrió que se expresaba intensamente en los timocitos corticales y la leucemia linfoblástica aguda de linaje T (T-ALL), mientras que los linfocitos de sangre periférica normales parecían mostrar solo niveles de expresión bajos. Se ha informado y usado como marcador para la detección de enfermedad residual mínima (MRD) en T-ALL. Además, el CD99 se encuentra en la superficie celular de los tumores de sarcoma de Ewing (EWS) y es positivo en los tumores de células de la granulosa. La expresión de la superficie celular de CD99 es una característica muy consistente de EWS, y de hecho, actualmente el CD99 está considerado como uno de los mejores marcadores
20 inmunohistoquímicos de diagnóstico para esta enfermedad. Cuando se reduce la expresión de CD99 en células de sarcoma de Ewing humanas, y esas células se injertan en ratones, se reduce el desarrollo de tumores y metástasis óseas.

25 La expresión de CD99 se ha comparado en células madre de leucemia mieloide aguda (AML LSC) en comparación con las células madre hematopoyéticas normales (HSC) y se ha demostrado que aumenta 5,6 veces en AML LSC en comparación con HSC, lo que sugiere que CD99 puede servir como un marcador de AMLSC en el direccionamiento del tumor.

30 La WO 2016/022971 describe las proteínas de fusión SIRP alfa-anticuerpo. La WO 2005/025618 describe el tratamiento de la artritis reumatoide con antagonistas de CD99. Levy (1979) PNAS 76(12): 6552-6556 describe un antígeno de leucemia tímica humana definido por anticuerpos monoclonales de hibridoma. La US 8.722.043 describe la inducción de la expresión de p53 por neutralización de neuropilina-2 para el tratamiento de cánceres. La US 2012/282257 describe un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) capaz de reconocer y unirse a la proteína humana de CD99.

35 La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD99 que tienen baja inmunogenicidad en humanos.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado aislado que se une específicamente al CD99 humano y comprende: (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 y (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 5, en donde las cadenas variables se construyen sobre un supercóntigo de IgG1 humano.

45 La invención proporciona además un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención.

La invención proporciona además una célula que produce un anticuerpo de la invención.

50 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 La invención proporciona además un anticuerpo de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende administrar el anticuerpo a un sujeto en una dosis eficaz para reducir el número de células cancerosas en el sujeto.

60 Se divulgan composiciones y métodos relacionados con anticuerpos monoclonales anti-CD99 humanizados o quiméricos. Los anticuerpos se unen a CD99 humano y encuentran uso en varios métodos terapéuticos. Las realizaciones incluyen anticuerpos aislados y derivados y fragmentos de los mismos, formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos monoclonales anti-CD99 humanizados o quiméricos; y líneas celulares que producen estos anticuerpos monoclonales. También se proporcionan secuencias de aminoácidos de los anticuerpos.

65 Los anticuerpos de interés incluyen los anticuerpos humanizados o quiméricos proporcionados, y variantes de los mismos. Los anticuerpos monoclonales de la invención encuentran utilidad particular como reactivos para el diagnóstico y la inmunoterapia de enfermedades asociadas con CD99 en humanos, particularmente en la terapia

contra el cáncer. Una ventaja de los anticuerpos monoclonales de la invención deriva del proceso de humanización. Por tanto, el uso *in vivo* de los anticuerpos monoclonales de la invención para inmunoterapia reduce en gran medida los problemas de la respuesta inmune del huésped significativa a los anticuerpos.

En la presente se contemplan varias formas de los anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD99 puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado de longitud completa, por ejemplo, que tiene una región constante de inmunoglobulina humana de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, etc. o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento F(ab), etc. Los fragmentos que comprenden regiones de CDR también son de interés, por ejemplo, con propósitos de imagenología. Además, el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse en una fase sólida y/o conjugarse con un compuesto heterólogo. El anticuerpo también puede proporcionarse como un anticuerpo biespecífico o multiespecífico reactivo con un segundo antígeno, que incluye particularmente otros antígenos para cáncer; o con reactivos de inmunoterapia, por ejemplo, CTLA-4, CD40, CD47 y similares.

Se contemplan usos diagnósticos y terapéuticos para el anticuerpo, particularmente relacionados con la detección y eliminación de células indeseables que expresan CD99. En una aplicación de diagnóstico, en la presente se divulga un método para determinar la presencia de células cancerosas que expresan CD99, que comprende exponer una muestra del paciente sospechosa de contener células cancerosas que expresan CD99 al anticuerpo anti-CD99 y determinar la unión del anticuerpo a la muestra. Para este uso, en la presente se divulga un kit que comprende el anticuerpo e instrucciones para usar el anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención son particularmente eficaces en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, matando células cancerosas por ADCC u otros mecanismos, aumentando la fagocitosis de las células que expresan CD99 mediante una terapia de combinación con un reactivo anti-CD47; y similares. El tratamiento puede ser sistémico o localizado, por ejemplo, administración por inyección intratumoral, etc.

En la presente se divulgan anticuerpos aislados y derivados y fragmentos de los mismos que comprenden por lo menos una, habitualmente por lo menos 3 secuencias de la CDR como se proporciona en la presente, habitualmente en combinación con secuencias marco de una región variable humana o como un péptido de CDR aislado. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende por lo menos una cadena ligera que comprende las 3 secuencias de la CDR de la cadena ligera proporcionadas en la presente situadas en un marco de región variable, que puede ser, sin limitación, un marco de región variable humano o de ratón, y por lo menos una cadena pesada que comprende 3 secuencias de la CDR de la cadena pesada proporcionadas en la presente situadas en un marco de región variable, que puede ser, sin limitación, un marco de región variable humano o de ratón.

También se divulga un anticuerpo que comprende una variante de secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR de los anticuerpos proporcionados, dicha variante comprende una o más inserciones de aminoácidos dentro o adyacentes a un residuo y/o delección de CDR dentro o adyacente a un residuo y/o sustitución de CDR de residuos de CDR (siendo la sustitución el tipo preferido de alteración de aminoácidos para generar tales variantes). Tales variantes tendrán normalmente una afinidad de unión para CD99 humano de por lo menos aproximadamente 10⁻⁸ M y se unirán al mismo epítipo que un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de las expuestas en la presente. En la presente se contemplan varias formas de los anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, que tiene una región constante de inmunoglobulina humana de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, etc. o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento F(ab), etc. Además, el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse en una fase sólida y/o conjugarse con un compuesto heterólogo.

La invención proporciona además: ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos y variantes de los mismos; un vector que comprende ese ácido nucleico, opcionalmente enlazado operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una célula huésped que comprende ese vector; un proceso para producir el anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de tal manera que el ácido nucleico se exprese y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula huésped (por ejemplo, del medio de cultivo de la célula huésped). La invención también proporciona una composición que comprende uno o más de los anticuerpos anti-CD99 humanizados y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Esta composición para uso terapéutico es estéril y puede liofilizarse, por ejemplo, proporcionándose como un pre-envase en una dosis unitaria con diluyente y dispositivo de administración, por ejemplo, inhalador, jeringuilla, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de regiones variables pesadas (A) y ligeras (B). Las CDR están marcadas como se indica.
Figura 2. Comparación de regiones variables 12E7 de ratón y humanizadas pesadas (A), SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; y ligeras (B) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. Las CDR están marcadas como se indica.
Figura 3. (A) El 12E7 humanizado se une al CD99 humano con afinidad y respuesta a la dosis similares en comparación con el 12E7 quimérico que comparte dominios variables con el anticuerpo original. La proteína

de fusión CD99/Fc humana se recubrió en una placa de 96 pocillos y se añadieron diferentes concentraciones de los anticuerpos indicados. El anticuerpo Kappa antihumano conjugado con HRP se usó como anticuerpo secundario. (B) Hu12E7-G1 compitió con el 12E7 de ratón original para la unión a CD99 humano. La proteína de fusión CD99/Fc humana se recubrió en una placa de 96 pocillos y se añadieron 0,5 µg de 12E7 de ratón a la placa en ausencia o presencia de 1X-, 10X-, 50X- o 100X veces más de Hu12E7-G1. El anticuerpo kappa anti-ratón conjugado con HRP se usó como un anticuerpo secundario para detectar la unión de 12E7 de ratón a CD99.

Figura 4. Hu12E7-2-G1 con un marco diferente en la región de VH, SEQ ID NO: 5, (A. Las CDR se indican en negrita) se une a CD99 de manera equivalente a Hu12E7-G1 (B).

Figura 5. Los anticuerpos monoclonales anti-CD99 promueven la fagocitosis potente de las células objetivo que expresan CD99. HL60-CD99^{hi} (A) y células de AML humanas primarias (B) se marcaron con CFSE y se incubaron con macrófagos derivados de sangre periférica humana en una proporción de 4:1 de objetivo a célula efectora. Dos horas después, se tomaron imágenes de los macrófagos por microscopía de fluorescencia para detectar la fagocitosis. El índice fagocítico (número de células objetivo ingeridas por 100 macrófagos) se determinó para cada condición por duplicado.

Figura 6. Hu12E7-G1 induce potentemente ADCC. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) se investigó usando células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como efectores y HL60-CD99^{hi} como células objetivo in vitro. Un anticuerpo anti-CD47, Chi B6H12 IgG1 sirvió como control positivo.

Figura 7: Los anticuerpos monoclonales para CD99 antihumanos eliminan las células de AML humanas primarias in vivo. (A) Las células AML humanas primarias de tres casos independientes se trasplantaron a ratones NSG inmunodeficientes. 12 semanas después, se evaluó el injerto de AML en la sangre periférica y a los ratones se les asignó el tratamiento con IgG de ratón control, anticuerpo para CD99 antihumano de ratón (m12E7) o un anticuerpo quimérico 12E7-IgG1. Los ratones se trataron con 14 días de anticuerpo con dosis diarias de 100 µg, al final de lo cual la sangre periférica fue reevaluada para las células leucémicas. *p<0,001. (B) Las células AML humanas primarias de un caso se trasplantaron a ratones NSG inmunodeficientes. 10 semanas después, se evaluó el injerto de AML en la sangre periférica y a los ratones se les asignó tratamiento con IgG de ratón de control, 12E7-IgG1 quimérico, anticuerpo 12E7-IgG4 quimérico o 12E7-IgG1 humanizado. A los ratones se les trató con 14 días de anticuerpo con dosis diarias de 100 µg, al final de lo cual la sangre periférica fue reevaluada para las células leucémicas. *p<0,05. (C) Las células AML humanas primarias de dos casos independientes se trasplantaron a ratones NSG inmunodeficientes. 10 semanas después, se evaluó el injerto de AML en la médula ósea y a los ratones se les asignó tratamiento con IgG de ratón o Hu12E7-G1 de control. A los ratones se les trató con 14 días de anticuerpo con dosis diarias de 200 µg. Al final de los 14 días, se reevaluó la médula ósea para injerto leucémico por citometría de flujo. *p<0,001. Figura 8. El anticuerpo monoclonal anti-CD99 humano sinergiza con el CD47 anti-humano para eliminar las células de AML humanas primarias in vivo. Las células AML humanas primarias de dos casos independientes se trasplantaron a ratones NSG inmunodeficientes. 10 semanas después, se evaluó el injerto de AML en la médula ósea y a los ratones se les asignó tratamiento con IgG de ratón control, anticuerpo para CD99 antihumano de ratón (m12E7), CD47 antihumano (Hu5F9-G4) o una combinación de m12E7 y Hu5F9-G4. A los ratones se les trató con 14 días de anticuerpo con dosis diarias de 200 µg para m12E7 o dosis de 10 µg para Hu5F9-G4. Al final de los 14 días, la médula ósea se reevaluó para injerto leucémico por citometría de flujo. *p<0.02 para ambas comparaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanizados que son específicos para CD99. También se divulga un ácido nucleico y una secuencia de aminoácidos de dichos anticuerpos. Los anticuerpos encuentran uso en métodos terapéuticos y de diagnóstico asociados con CD99.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

"Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los "anticuerpos" (Abs) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de este último tipo son, por ejemplo, producidos en niveles bajos por el sistema linfático y en niveles elevados por mielomas.

Como se usa en esta invención, el término "epítipo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente de agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Los "anticuerpos e inmunoglobulinas nativas" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada (Clothia et al., J. Mol. Biol. 186: 651 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 4592 (1985)).

Los anticuerpos divulgados en la presente pueden ser biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos biespecíficos comprenden un sitio de unión para CD99 de acuerdo con las composiciones descritas en la presente, y un sitio de unión para SIRP α , CD47, marcadores de células cancerosas adicionales y similares. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden tener un bajo riesgo de toxicidad contra granulocitos (neutrófilos), células NK y células CD4⁺ como células espectadoras.

Los métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Procedimientos similares se divulgan en la WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991). De acuerdo con otro enfoque descrito en la WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. Tales interfaces pueden comprender por lo menos una parte del dominio de CH₃ de un anticuerpo de dominio constante. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, como los homodímeros. Un método alternativo enlaza dos regiones variables de cadena sencilla diferentes al antígeno termoestable (HSA). Usar el HSA como conector aumenta la vida media en suero y tiene el beneficio de una baja inmunogenicidad.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a la avidina, el otro a la biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a las células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden elaborarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan et al., Science, 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Luego, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tioi mediante 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.

También se han descrito varias técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kos-telny et al., J. Immunol, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios de V_H y V_L de un fragmento se ven forzados a aparearse con los dominios de V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Ver Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab y $F(ab')_2$), anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales o biespecíficos y complejos de anticuerpos tetraméricos. Se entiende que los anticuerpos son reactivos contra un antígeno seleccionado si se unen con una afinidad apropiada (constante de asociación), por ejemplo, mayor o igual que $10^7 M^{-1}$. Adicionalmente, los anticuerpos que pueden usarse en los métodos de la presente divulgación también pueden describirse o especificarse en términos de sus afinidades de unión e incluyen aquellos con una constante de disociación o Kd inferior a $5 \times 10^{-2} M$, $10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$, $10^{-3} M$, $5 \times 10^{-4} M$, $10^{-4} M$, $5 \times 10^{-5} M$, $10^{-5} M$, $5 \times 10^{-6} M$, $10^{-6} M$, $5 \times 10^{-7} M$, $10^{-7} M$, $5 \times 10^{-8} M$, $10^{-8} M$, $5 \times 10^{-9} M$, $10^{-9} M$, $5 \times 10^{-10} M$, $10^{-9} M$, $5 \times 10^{-11} M$, $10^{-11} M$, $5 \times 10^{-12} M$, $10^{-12} M$, $5 \times 10^{-13} M$, $10^{-13} M$, $5 \times 10^{-14} M$, $10^{-14} M$, $5 \times 10^{-15} M$, $10^{-15} M$.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres CDR, que forman giros que se conectan y, en algunos casos, formando parte de la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (ver 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 a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

Las secuencias de la región variable de las combinaciones de cadenas pesadas y ligeras anti-CD99 ejemplares se exponen en el listado de secuencias, que incluyen 12E7: SEQ ID NO: 1-5, donde las SEQ ID NO: 1, 2 y 5 son secuencias de V_H y las SEQ ID NO: 3-4 son secuencias de V_L . En algunas realizaciones, las secuencias variables para una combinación de cadena pesada y ligera como se expone en 12E7 se mantendrán particularmente en una combinación, es decir, un anticuerpo humanizado comprenderá tanto secuencias de CDR de la cadena pesada de 12E7 como secuencias de CDR de la cadena ligera de 12E7.

Una secuencia de V_H puede contener cualquiera de las secuencias de V_H divulgadas, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2 o 5; o puede comprender las secuencias de la CDR de V_H , SEQ ID NO: 6, 7 y 8, en el marco de una secuencia de V_H humana. Específicamente, las secuencias de la CDR de cadena pesada de 12E7 son: SEQ ID NO: 6, DTYIH (CDR1); SEQ ID NO: 7, RIDPANGNTKYDPKFQG (CDR2); SEQ ID NO: 8, RGGVD (CDR3).

Una secuencia de V_L puede contener cualquiera de las secuencias de V_L divulgadas, por ejemplo, SEQ ID NO: 3 o 4; o puede comprender las secuencias de la CDR de V_L , SEQ ID NO: 9, 10 y 11, en el marco de una secuencia de V_L humana. Las secuencias de la CDR de cadena ligera de 12E7 son SEQ ID NO: 9, KSSQSLLDGDGKTYLN (CDR1); SEQ ID NO: 10, LVSKLDS (CDR2); SEQ ID NO: 11, WQGTHFPRT (CDR3).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados 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 todavía es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. En una especie de Fv de dos cadenas, esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. En una especie de Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera puede enlazarse covalentemente mediante un conector peptídico flexible de tal manera que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR

de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero de 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 solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo. Para una revisión de scFv ver Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El fragmento Fab 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 unos pocos residuos en el extremo terminal carboxi del dominio de CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab' en la que los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

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, IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

"Fragmento de anticuerpo" y todas las variantes gramaticales del mismo, como se usa en la presente, se definen como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión a antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios constantes de la cadena pesada (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido que tenga una estructura primaria que consista en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (referido en la presente como "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), incluyendo sin limitación (1) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv) (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada y (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, las cadenas pesadas pueden contener cualquier secuencia de dominio constante (por ejemplo CH1 en el isotipo IgG) encontrada en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o pueden contener cualquier secuencia de la región bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o pueden contener una secuencia cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de la región bisagra o la secuencia del dominio constante de las cadenas pesadas.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "conjugado" como se describe y reivindica en la presente se define como una molécula heterogénea formada por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpo a una o más moléculas de polímero, en donde la molécula heterogénea es soluble en agua, es decir, soluble en fluidos fisiológicos como la sangre, y en donde la molécula heterogénea está libre de cualquier agregado estructurado. Un conjugado de interés es el PEG. En el contexto de la definición anterior, el término "agregado estructurado" se refiere a (1) cualquier agregado de moléculas en solución acuosa que tenga una estructura esferoide o de carcasa esferoide, de tal manera que la molécula heterogénea no esté en una micela u otra estructura de emulsión, y no está anclado a una bicapa lipídica, vesícula o liposoma; y (2) cualquier agregado de moléculas en forma sólida o insolubilizada, como una matriz de perlas de cromatografía, que no libera la molécula heterogénea en solución al entrar en contacto con una fase acuosa. Por consiguiente, el término "conjugado" como se define en la presente abarca la molécula heterogénea mencionada anteriormente en un precipitado, sedimento, matriz bioerosionable u otro sólido capaz de liberar la molécula heterogénea en solución acuosa tras la hidratación del sólido.

El término "anticuerpo monoclonal" (mAb), como se usa en la presente, 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 de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Cada mAb se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse mediante cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse en una célula B inmortalizada o hibridoma de la misma, o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante.

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos mediante corte y empalme de un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo anti-CD99 con un dominio constante de otra especie (por ejemplo, anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen o la designación de clase o subclase de inmunoglobulina, así como de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada. De particular interés son las regiones CDR de 12E7 definidas en la presente, cortadas y empalmadas en una secuencia marco de cadena variable humana.

Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las 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 las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más del 75% en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y lo más preferible más del 80%, 90% o 99% en peso, o (2) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos un paso de purificación.

El término "epítipo etiquetado" cuando se usa en la presente se refiere a un anticuerpo anti-CD99 fusionado con una "etiqueta de epítipo". El polipéptido de etiqueta de epítipo tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el cual puede elaborarse un anticuerpo, pero es lo suficientemente corto como para no interferir con la actividad del anticuerpo para CD99. La etiqueta de epítipo es preferiblemente lo suficientemente única como para que el anticuerpo específico para el epítipo no reaccione sustancialmente de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos 6 residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos (preferiblemente entre aproximadamente 9-30 residuos). Los ejemplos incluyen la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para ella (Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6):547-553 (1990)).

La palabra "marcador" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas abarcadas en la presente incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 4.275.149.

Polipéptidos

En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos que se unen específicamente a CD99, y a las líneas celulares que producen tales anticuerpos. Se proporcionan regiones variables de anticuerpos ejemplares. Los anticuerpos de interés incluyen estas combinaciones proporcionadas, así como fusiones de las regiones variables a regiones constantes apropiadas o fragmentos de regiones constantes, por ejemplo, para generar anticuerpos F(ab)'. Las regiones variables de interés incluyen por lo menos una secuencia de la CDR del anticuerpo anti-CD99 proporcionado, donde una CDR puede tener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más aminoácidos. Habitualmente, las regiones variables de interés incluyen un "conjunto" de secuencias de CDR, es decir, SEQ ID NO: 6, 7 y 8 en una región variable; y/o SEQ ID NO: 9, 10 y 11 en una región variable, donde las dos pueden emparejarse. Alternativamente, los anticuerpos de interés incluyen una región variable como se expone en los anticuerpos proporcionados, o pares de secuencias de regiones variables como se expone en la presente.

En algunas realizaciones, un polipéptido de interés tiene una secuencia contigua de por lo menos

aproximadamente 10 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 15 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 25 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos, hasta la región variable proporcionada completa. Los polipéptidos de interés también incluyen secuencias de regiones variables que difieren en hasta uno, hasta dos, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6 o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en la presente. En otras realizaciones, un polipéptido de interés es por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la presente.

Además de los Fabs, también se contemplan fragmentos de anticuerpos más pequeños y péptidos de unión a epítipo que tienen especificidad de unión para por lo menos un epítipo de CD99 y también pueden usarse en los métodos de la divulgación. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla pueden construirse de acuerdo con el método de la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 de Ladner et al. Los anticuerpos de cadena sencilla comprenden las regiones variables de las cadenas ligera y pesada unidas por una fracción conectora flexible. Aún más pequeño es el fragmento de anticuerpo conocido como anticuerpo de dominio único, que comprende un dominio único de VH aislado. Las técnicas para obtener un anticuerpo de dominio único con por lo menos algo de la especificidad de unión del anticuerpo intacto del que derivan se conocen en la técnica. Por ejemplo, Ward, et al. en "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia coli*", Nature 341: 644-646, divulgan un método de selección para obtener una región variable de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de dominio único H) con suficiente afinidad para su epítipo objetivo para unirse al mismo de manera aislada.

En la presente se divulgan ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-CD99 humanizados o quiméricos, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Los ácidos nucleicos de interés pueden ser por lo menos aproximadamente un 80% idénticos a las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 99% o idénticos. En algunas realizaciones, puede usarse una secuencia de nucleótidos contigua como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5 de por lo menos aproximadamente 20 nt., por lo menos aproximadamente 25 nt, por lo menos aproximadamente 50 nt., Por lo menos aproximadamente 75 nt, por lo menos aproximadamente 100 nt, y hasta la secuencia proporcionada completa. Tales secuencias contiguas pueden codificar cualquiera o todas las secuencias de CDR proporcionadas, o pueden codificar una región variable completa. Como se conoce en la técnica, una secuencia de región variable puede fusionarse con cualquier secuencia de región constante apropiada.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se inserta en un vector replicable para su clonación adicional (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Hay disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: 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.

El anticuerpo anti-CD99 de esta invención puede producirse de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo u homólogo, que incluye una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína o polipéptido maduro, una secuencia de la región constante de inmunoglobulina, y similares. Una secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente puede ser una que sea reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpos nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente se asocia en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan ordinariamente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionaria humana (células 293 o 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 mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical 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 hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1.982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-CD99 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como el vidrio de poro controlado o el poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Donde el anticuerpo comprende un dominio de CH_3 , la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE, y la precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Después de cualquier paso de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizado a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Métodos de uso

En la presente se divulgan métodos para reducir el crecimiento de células cancerosas. Los métodos permiten disminuir el número de células cancerosas que expresan CD99 incluyendo, entre otras, las células de cáncer de pulmón y las células de AML. En general, los métodos comprenden poner en contacto una célula cancerosa con un anticuerpo proporcionado en la presente, habitualmente poner en contacto in vivo en condiciones que provocan la muerte celular de las células cancerosas que expresan CD99, por ejemplo, por ADCC, por aumento de la fagocitosis, etc.

En una realización, el cáncer es un cáncer hematológico. En una realización, el cáncer hematológico es una leucemia. En otra realización, el cáncer hematológico es un mieloma. En una realización, el cáncer hematológico es un linfoma.

En una realización, la leucemia se selecciona entre leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mielógena crónica (CML). En una realización, la leucemia es AML. En una realización, la leucemia es ALL. En una realización, la leucemia es CLL. En una realización adicional, la leucemia es CML. En una realización, la célula cancerosa es una célula leucémica, por ejemplo, pero no limitada a, una célula de AML, una célula de ALL, una célula de CLL o una célula de CML.

En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer de pulmón, por ejemplo, SCLC, no SCLC, particularmente SCLC.

"Reducir el crecimiento de células cancerosas" incluye, pero no se limita a, reducir la proliferación de células cancerosas y reducir la incidencia de que una célula no cancerosa se convierta en una célula cancerosa. Puede determinarse fácilmente si se ha logrado una reducción en el crecimiento de células cancerosas usando cualquier ensayo conocido incluyendo, pero no limitado a, la incorporación de [^3H] -timidina; contando el número de células durante un período de tiempo; detectando y/o midiendo CD99, etc.

En la presente se divulgan métodos para tratar el cáncer, que generalmente comprenden administrar a un individuo con necesidad de ello un anticuerpo anti-CD99 de la divulgación, en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento de células cancerosas y tratar el cáncer. Puede evaluarse si una sustancia, o una cantidad específica de la sustancia, es efectiva en el tratamiento del cáncer usando cualquiera de una variedad de ensayos de diagnóstico conocidos para el cáncer incluyendo, pero no limitados a, biopsia, estudios radiográficos de contraste, tomografía axial computarizada y detección de un marcador tumoral asociado con cáncer en la sangre o biopsia del individuo. El

anticuerpo puede administrarse sistémicamente o localmente, generalmente sistémicamente.

Una sustancia, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico que reduce el crecimiento de células cancerosas, puede dirigirse a una célula cancerosa con un anticuerpo de la invención. Por tanto, en la presente se divulga un método para administrar un fármaco a una célula cancerosa, que comprende administrar un complejo fármaco-anticuerpo a un sujeto, en donde el anticuerpo es específico para CD99, y el fármaco es uno que reduce el crecimiento de células cancerosas, una variedad de los cuales es conocido en la técnica. El direccionamiento puede lograrse mediante acoplamiento (por ejemplo, enlazando, directamente o mediante una molécula conectora, ya sea covalente o no covalentemente, para formar un complejo fármaco-anticuerpo) un fármaco a un anticuerpo específico para un polipéptido asociado al cáncer. Los métodos para acoplar un fármaco a un anticuerpo son bien conocidos en la técnica y no necesitan desarrollarse en la presente.

Los cánceres pueden estadificarse por análisis de la presencia de células madre cancerosas. La estadificación es útil para el pronóstico y el tratamiento. Una muestra de un paciente con cáncer puede teñirse con un anticuerpo de la invención. En una realización, la muestra del paciente se compara con un control o un valor de prueba estándar. En otra realización, la muestra del paciente se compara con una muestra de pre-leucemia, o con uno o más puntos temporales a lo largo del curso de la enfermedad.

Las muestras, incluidas las secciones de tejido, los portaobjetos, etc. que se sospecha que contienen células cancerosas, se tiñen con reactivos específicos para CD99, además de otros marcadores específicos de cáncer. Las muestras pueden congelarse, embeberse, presentarse en una micromatriz de tejidos y similares. Los reactivos, por ejemplo, anticuerpos, sondas de polinucleótidos, etc. pueden marcarse de manera detectable, o pueden marcarse indirectamente en el procedimiento de tinción. Los datos proporcionados en la presente demuestran que el número y la distribución de las células progenitoras es diagnóstico del estadio del cáncer.

La información así derivada es útil en el pronóstico y el diagnóstico, incluyendo la susceptibilidad a la aceleración de la enfermedad, el estado de un estado de enfermedad y la respuesta a los cambios en el entorno, como el paso del tiempo, el tratamiento con fármacos u otras modalidades. Las células también pueden clasificarse por su capacidad para responder a agentes y tratamientos terapéuticos, aislarse con propósitos de investigación, seleccionarse para la expresión génica y similares. Las muestras clínicas pueden caracterizarse además por análisis genéticos, proteómica, tinción de la superficie celular u otros medios, para determinar la presencia de marcadores que son útiles en la clasificación. Por ejemplo, las anomalías genéticas pueden ser causa de susceptibilidad a la enfermedad o de respuesta al fármaco, o pueden estar vinculadas a tales fenotipos.

Además, la detección de células positivas para CD99 puede usarse para monitorizar la respuesta a la terapia y ayudar en el pronóstico. Las muestras clínicas para su uso en los métodos de la divulgación pueden obtenerse de una variedad de fuentes, particularmente sangre, aunque en algunos casos pueden usarse muestras como médula ósea, linfa, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y similares. Dichas muestras pueden separarse por centrifugación, elutriación, separación por gradiente de densidad, aféresis, selección de afinidad, adsorción, FACS, centrifugación con Hypaque, etc. antes del análisis, y habitualmente se usará una fracción mononuclear (PBMC). Una vez que se obtiene una muestra, puede usarse directamente, congelarse o mantenerse en un medio de cultivo apropiado durante cortos períodos de tiempo. Pueden emplearse varios medios para mantener las células. Las muestras pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento conveniente, como extracción de sangre, punción venosa, biopsia o similares. Habitualmente, una muestra comprenderá por lo menos aproximadamente 10^2 células, más habitualmente por lo menos aproximadamente 10^3 células, y preferiblemente 10^4 , 10^5 o más células. Típicamente, las muestras serán de pacientes humanos, aunque los modelos animales pueden encontrar uso, por ejemplo, equino, bovino, porcino, canino, felino, roedor, por ejemplo, ratones, ratas, hámster, primates, etc.

Puede usarse una solución apropiada para la dispersión o suspensión de la muestra celular. Dicha solución será generalmente una solución salina equilibrada, por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc., convenientemente suplementada con suero fetal de ternera u otros factores de origen natural, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5 a 5 25 mM. Los tampones convenientes incluyen HEPES, tampones de fosfato, tampones de lactato, etc.

El análisis de la tinción celular usará métodos convencionales. Las técnicas que proporcionan una enumeración precisa incluyen clasificadores de células activadas por fluorescencia, que pueden tener varios grados de sofisticación, como múltiples canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, canales de impedancia, etc. Las células pueden seleccionarse contra las células muertas empleando tintes asociados con células muertas (por ejemplo yoduro de propidio).

Los reactivos de afinidad pueden ser receptores o ligandos específicos para las moléculas de la superficie celular indicadas anteriormente. Además de los reactivos de anticuerpos, pueden usarse pares de péptido-antígeno MHC y receptor de células T; ligandos peptídicos y receptores; moléculas efectoras y receptoras, y similares. Los anticuerpos y los receptores de células T pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser producidos por animales transgénicos, animales inmunizados, células B humanas o animales inmortalizadas, células transfectadas

con vectores de ADN que codifican el anticuerpo o el receptor de células T, etc. Los detalles de la preparación de los anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión específicos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

De interés es el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. Convenientemente, estos anticuerpos se conjugan con un marcador para su uso en separación. Los marcadores incluyen perlas magnéticas, que permiten la separación directa, biotina, que puede eliminarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que pueden usarse con un clasificador celular activado por fluorescencia, o similares, para facilitar la separación del tipo de célula particular. Los fluorocromos que encuentran uso incluyen las ficobiliproteínas, por ejemplo, la ficoeritrina y las alofococianinas, la fluoresceína y el rojo de Texas. Frecuentemente, cada anticuerpo está marcado con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente de cada marcador.

Los anticuerpos se añaden a una suspensión de células y se incuban durante un período de tiempo suficiente para unir los antígenos de la superficie celular disponibles. La incubación habitualmente durará por lo menos aproximadamente 5 minutos y habitualmente menos de aproximadamente 30 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de la reacción, de tal manera que la eficacia de la separación no esté limitada por la falta de anticuerpos. La concentración apropiada se determina mediante titulación. El medio en el que se separan las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene del 0,1 al 0,5% de BSA. Varios medios están disponibles comercialmente y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluyendo medio de Eagle modificado de Dulbecco (dMEM), Solución de sal básica de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMO, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., frecuentemente suplementado con suero de ternera fetal, BSA, HSA, etc.

Las células marcadas se cuantifican luego en cuanto a la expresión de marcadores de superficie celular como se ha descrito anteriormente.

La comparación de un análisis diferencial obtenido de una muestra de paciente y un análisis diferencial de referencia se logra mediante el uso de protocolos de deducción adecuados, sistemas de AI, comparaciones estadísticas, etc. Una comparación con un análisis progenitor diferencial de referencia de células normales, células de tejido enfermo de manera similar y similares pueden proporcionar una indicación de la estadificación de la enfermedad. Puede compilarse una base de datos de análisis progenitores diferenciales de referencia. Un análisis de particular interés hace un seguimiento de un paciente, por ejemplo, en las etapas crónicas y preleucémicas de la enfermedad, de tal manera que la aceleración de la enfermedad se observa en una etapa temprana. Los métodos de la divulgación proporcionan una detección de la aceleración antes de la aparición de los síntomas clínicos, y por lo tanto permiten la intervención terapéutica temprana, por ejemplo inicio de quimioterapia, aumento de la dosis de quimioterapia, cambio de selección de fármaco quimioterapéutico y similares.

Los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la divulgación pueden usarse en la modulación de la fagocitosis en combinación con un reactivo anti-CD47, incluyendo los métodos expuestos en la Solicitud Internacional US2009/000319, la WO 2013/109752 y la WO 2011/143624. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos de la invención en combinación con un agente anti-CD47 pueden administrarse para aumentar la fagocitosis de las células cancerosas que expresan CD99.

Un agente anti-CD47 para su uso en los métodos de la divulgación interfiere con la unión entre CD47 presente en una célula objetivo incluyendo, sin limitación, una célula cancerosa, una célula infectada con un patógeno intracelular, una célula madre, etc., a SIRPα presente en una célula fagocítica. Generalmente, ambas células están presentes en el individuo que se está tratando. Tales métodos, en presencia de una señal pro-fagocítica, pueden aumentar la fagocitosis de la célula objetivo. Los métodos en cuestión pueden usarse para tratar a un sujeto por cualquier enfermedad susceptible al bloqueo de la señalización de SIRPα mediada por CD47. Los agentes anti-CD47 adecuados incluyen polipéptidos de SIRPα solubles; CD47 soluble; anticuerpos anti-CD47, anticuerpos anti-SIRPα y similares, donde el término anticuerpos abarca fragmentos de anticuerpos y variantes de los mismos, como se conoce en la técnica.

Típicamente, la dosificación del agente anti-CD47 será de 0,001 a 100 miligramos de proteína por kilogramo de peso corporal del sujeto. La proporción de anticuerpo anti-CD47 a anticuerpo anti-CD99 puede variar de 1:100; 1:50; 1:10; 1:5; 1:2; 1:1; 2:1; 5:1; 10:1; 50:1; 100:1. Los agentes pueden administrarse al sujeto en una serie de más de una administración. Para composiciones terapéuticas, a veces se requerirá una administración periódica regular (por ejemplo, cada 2-3 días), o puede ser deseable para reducir la toxicidad. Para las composiciones terapéuticas que se utilizarán en regímenes de dosis repetidas, se prefieren fracciones de anticuerpos que no provoquen HAMA u otras respuestas inmunes.

Los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la divulgación pueden usarse *in vitro* e *in vivo* para monitorizar el curso de la terapia de la enfermedad de CD99. Así, por ejemplo, midiendo el aumento o la disminución en el número de células que expresan CD99, particularmente las células cancerosas que expresan

CD99, puede determinarse si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar la enfermedad es eficaz.

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse *in vitro* en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unidos a un portador en fase sólida. Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos pueden marcarse de manera detectable de varias maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la invención son citometría de flujo, por ejemplo, FACS, MACS, inmunohistoquímica, inmunoensayos competitivos y no competitivos, ya sea en formato directo o indirecto; y similares. La detección de antígenos usando los anticuerpos monoclonales de la invención puede hacerse utilizando inmunoensayos que se ejecutan en los modos directo, inverso o simultáneo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Los expertos en la técnica conocerán, o podrán discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin experimentación excesiva.

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden unirse a muchos portadores diferentes y usarse para detectar la presencia de células que expresan CD99. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosa y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros portadores adecuados para unir anticuerpos monoclonales, o podrán determinarlos, usando experimentación de rutina.

Hay muchos marcadores y métodos de marcado diferentes conocidos por los expertos en la técnica, que encuentran uso como trazadores en métodos terapéuticos, para su uso en métodos de diagnóstico, y similares. Para fines de diagnóstico, un marcador puede estar unido de forma covalente o no covalente a un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo, incluyendo fragmentos que consisten o comprenden secuencias de CDR. Los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para unirse a los anticuerpos monoclonales de la invención, o podrán determinarlos, usando experimentación de rutina. Además, la unión de estos marcadores a los anticuerpos monoclonales de la invención puede hacerse usando técnicas estándar comunes a los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo está unido a una nanopartícula, por ejemplo, para uso en imagenología. Las nanopartículas útiles son las conocidas en la técnica, por ejemplo, incluyendo sin limitación, nanopartículas Raman-sílice-oro (R-Si-Au-NP). Las R-Si-Au-NP consisten de una molécula orgánica Raman, con una firma espectral de banda estrecha, adsorbida en un núcleo de oro. Como la molécula orgánica Raman puede cambiarse, cada nanopartícula puede llevar su propia firma, permitiendo de este modo que múltiples nanopartículas se detecten independientemente de manera simultánea mediante multiplexación. La nanopartícula entera está encapsulada en una cubierta de sílice para mantener la molécula orgánica Raman en el nanonúcleo de oro. La (PEG)-ilación de polietilenglicol opcional de las R-Si-Au-NP aumenta su biodisponibilidad y proporciona "asas" funcionales para unir fracciones dirigidas (ver Thakor et al (2011) Sci Transl Med. 3(79):79ra33; Jokerst et al. (2011) Small. 7(5):625-33; Gao et al. (2011) Biomaterials. 32(8):2141-8).

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden detectar CD99 cuando está presente en fluidos biológicos y en tejidos, in vivo o in vitro. Puede usarse cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de CD99. Una muestra puede ser un líquido como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y similares, o un sólido o semisólido como tejidos, heces y similares, o, alternativamente, un tejido sólido como los usados comúnmente en diagnóstico histológico.

Otra técnica de marcado que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en acoplar los anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos pueden luego detectarse específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos como la biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

Por conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloque o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los varios reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. La composición de anticuerpos se

formulará, dosificará y administrará de manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir la enfermedad asociada a CD99.

Una composición farmacéutica puede comprender anticuerpo liofilizado, por ejemplo, en una formulación unitaria de una dosis terapéutica; o puede proporcionarse como una dosis unitaria en un excipiente estéril adecuado para la administración, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml.

La dosis terapéutica puede ser por lo menos aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal, por lo menos aproximadamente 0,05 µg/kg de peso corporal; por lo menos aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal, por lo menos aproximadamente 0,5 µg/kg de peso corporal, por lo menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, por lo menos aproximadamente 2,5 µg/kg de peso corporal, por lo menos aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, y no más de aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal. Un experto en la técnica entenderá que dichas pautas se ajustarán para el peso molecular del agente activo, por ejemplo, en el uso de fragmentos de anticuerpos o en el uso de conjugados de anticuerpos. La dosificación también puede variarse para administración localizada, por ejemplo, intranasal, inhalación, etc., o para administración sistémica, por ejemplo, i.m., i.p, i.v., y similares.

El anticuerpo no necesita ser, pero está formulado opcionalmente con uno o más agentes que potencian la actividad, o que de otro modo aumentan el efecto terapéutico. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se usaron anteriormente en la presente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones iónicos formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones para ser usadas para la administración *in vivo* debe ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los ingredientes activos también pueden quedar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en la 16ª edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980)

El anticuerpo anti-CD99 se administra mediante cualquier medio adecuado incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-CD99 se administra adecuadamente mediante infusión de pulso, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente al mismo tiempo o durante una serie de tratamientos.

En la presente se divulga un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-CD99. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que

la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1

Anticuerpos monoclonales para CD99 antihumanos de ratón humanizados y quiméricos

Un anticuerpo monoclonal anti-CD99, 12E7, se unió específicamente al CD99 humano e inhibió el crecimiento tumoral in vivo. Los anticuerpos 12E7 quiméricos y humanizados se diseñaron y construyeron luego en base al 12E7 de ratón original para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos murinos. Todos los anticuerpos derivados de 12E7, incluidos 12E7 de ratón, 12E7-IgG1 quimérico y 12E7-IgG1 humanizado indujeron una fagocitosis potente in vitro y eliminaron las células de AML de manera eficaz en el modelo de xenoinjertos in vivo. Además, el 12E7 de ratón se sinergizó con el anticuerpo anti-CD47 para erradicar la AML in vivo. Nuestros descubrimientos sugieren que los anticuerpos anti-CD99 que desarrollamos, ya sea como agentes únicos o en combinación, pueden usarse para dirigirse a AML.

Detectamos una expresión aumentada de CD99 en las células madre de leucemia mieloide aguda (AML LSC) en comparación con las células madre hematopoyéticas normales (HSC), representando por tanto un marcador de AML LSC que puede ser un objetivo para los anticuerpos monoclonales (mAb) terapéuticos en el tratamiento de pacientes con AML de novo, de recaída o refractaria. Se ha generado previamente un clon de hibridoma 12E7 y se descubrió que se une específicamente a CD99 humano. Aquí, describimos la clonación de las regiones variables de 12E7 y la generación de anticuerpos 12E7 quiméricos y humanizados. Demostramos que tanto el 12E7 quimérico como el humanizado muestran una potente eficacia para desencadenar la fagocitosis de las células de AML in vitro y eliminar las células de AML in vivo. Además, demostramos que el 12E7 de ratón sinergizó con el anticuerpo anti-CD47 para erradicar la AML in vivo. Estos resultados indican que nuestros anticuerpos monoclonales basados en 12E7 pueden usarse o como agentes individuales o en estrategias de combinación para terapia para la AML.

Resultados y análisis

Generación de anticuerpo monoclonal contra CD99 humano. Se identificó un clon de hibridoma de ratón, 12E7, para producir un anticuerpo monoclonal con especificidad contra CD99 humano. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de 12E7 se clonaron a partir del hibridoma usando cebadores de anticuerpos universales. Se secuenciaron múltiples clones de cada producto del gen V para monitorizar los errores inducidos por PCR. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de la VH y VL de 12E7, y las secuencias de aminoácidos deducidas se muestran en la Figura 1A y B, respectivamente. El análisis de la secuencia de ADN demostró que la cadena pesada de 12E7 usa un segmento V de la familia IGHV14, y que la cadena ligera pertenece al subgrupo IGKV1.

Humanización del anticuerpo 12E7. Para seleccionar los marcos de anticuerpos humanos (FR) para usar como plantillas para el injerto de CDR, se compararon las regiones de la VL y la VH de 12E7 de ratón con las de las secuencias de la línea germinal humana. Se descubrió que las FR de la región VL de 12E7 de ratón tenían la mayor homología con el subgrupo IGKV2-29, y las FR de la región VH mostraban la homología más alta con el subgrupo IGHV1-2 humano. Por lo tanto, se usaron los FR de IGKV2-29 e IGHV1-2 humanos como bases para diseñar el 12E7 humanizado. Las posiciones de aminoácidos en las regiones FR que difieren entre las secuencias de 12E7 e IGKV2-29/IGHV1-2 y que pueden tener influencia en la unión al antígeno se identificaron mediante modelado molecular. Los residuos idénticos en las FR se conservaron y los residuos no idénticos o se conservaron o sustituyeron según el programa de modelado molecular. Los alineamientos de secuencias de VH y VL de ratón y humanizadas se muestran en la Figura 2.

Caracterización de la actividad de unión al antígeno del anticuerpo 12E7 humanizado. Las regiones variables de 12E7 de ratón y humanizadas se construyeron luego sobre un supercóntigo de IgG1 humana para

hacer 12E7-G1 quimérico (Ch12E7-G1) y 12E7-G1 humanizado (Hu12E7-G1), respectivamente. La transfección transitoria se llevó a cabo en células 293, y los anticuerpos resultantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Para evaluar la actividad de unión al antígeno de Hu12E7-G1, se realizó un ELISA recubriendo con proteína de fusión CD99/Fc humana como cebo. Como se muestra en la Figura 3A, Hu12E7-G1 se unió a CD99 de una manera dependiente de la dosis. Además, la actividad de unión de Hu12E7-G1 fue comparable a la de Ch12E7-G1 que posee las regiones variables de ratón originales del anticuerpo 12E7, lo que sugiere que Hu12E7-G1 retuvo una actividad de unión a antígeno similar en comparación con su anticuerpo original. Además, realizamos un ELISA de competición entre Hu12E7-G1 y el 12E7 de ratón original. Como se ve en la Figura 3B, el 12E7 de ratón se unió a CD99 humano. Sin embargo, su actividad de unión se redujo cuando se añadió Hu12E7-G1, y el grado de competición coincidió con la concentración relativa de Hu12E7-G1. Estos resultados sugieren que Hu12E7-G1 posee una afinidad y especificidad similar a la de su anticuerpo original.

También hemos construido una versión diferente de 12E7-G1 humanizado (Hu12E7-2-G1) que tiene una secuencia diferente en la región de VH (Figura 4A), y los datos de unión de ELISA mostraron que se unía a CD99 a un nivel comparable al de Hu12E7-G1 (Figura 4B).

Hu12E7-G1 induce una fagocitosis de AML mediada por macrófagos potente. Para estudiar el mecanismo de acción de los anticuerpos 12E7, primero investigamos si los anticuerpos 12E7 provocan fagocitosis que se ha demostrado que desempeña un papel importante en los efectos antitumorales mediados por anticuerpos. Se probó una línea celular de AML, HL60-CD99^{hi}, en presencia de anticuerpos 12E7 junto con macrófagos derivados de sangre periférica humana. La actividad fagocítica se midió contando el número de células HL60-CD99^{hi} marcadas con CFSE ingeridas detectadas por microscopía de fluorescencia. Como se ve en la Figura 5A, Ch12E7-G1 permitió eficientemente la fagocitosis de las células HL60-CD99^{hi} a un nivel comparable a la del 12E7 de ratón nativo. Para determinar si la fagocitosis impulsada por Ch12E7-G1 depende del dominio constante del anticuerpo (Fc), construimos Ch12E7-G4 en el que los dominios variables de 12E7 de ratón se injertaron en un formato de IgG4 humana. Ch12E7-G4 no pudo estimular la fagocitosis, lo que sugiere que se requiere la participación de los receptores de Fc para la fagocitosis inducida por Ch12E7-G1.

También probamos la fagocitosis de las células de AML humanas primarias inducida por anticuerpos 12E7. En este estudio, Hu12E7-G1 indujo una potente fagocitosis de seis muestras de AML primarias diferentes recogidas de pacientes (n=6/6) (Fig. 5B). Tomados en conjunto, estos resultados indican que los anticuerpos 12E7 pueden estimular la fagocitosis de las células que expresan CD99 por los macrófagos de una manera dependiente de Fc.

Hu12E7-G1 induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos que se unen a antígenos específicos de la superficie celular en las células objetivo pueden inducir citotoxicidad mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por la región constante de Fc del anticuerpo, particularmente Fc de IgG1 humana. Como el 12E7 humanizado se construyó como un formato de IgG1 humana, a continuación investigamos la capacidad de Hu12E7-G1 para mediar en la ADCC. Se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en bioluminiscencia aCella-TOX™, en el que se usaron células HL60-CD99^{hi} como células objetivo y se usaron PBMC humanas estimuladas con IL-2 como células efectoras en una proporción de E/T de 100:1. Como se ilustra en la Figura 6 Hu12E7-G1, pero no HulgG1, indujo efectivamente la ADCC de una manera dependiente de la dosis. De acuerdo con nuestros datos anteriores, chB6H12-G1, que es un anticuerpo específico para CD47 humano, pudo mediar la ADCC, y por tanto se usó como control positivo en este experimento.

Además, se evaluó la capacidad de Hu12E7-G1 para mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) con células HL60-CD99^{hi}. Sin embargo, no se observó ninguna CDC mediada por Hu12E7-G1 contra las células HL60-CD99^{hi}, aunque el rituximab, que se usó como control positivo, pudo desencadenar la CDC contra células Raji. Además, se evaluó la inducción de apoptosis usando un ensayo de citometría de flujo de anexina V con células HL60-CD99^{hi}. Hu12E7-G1 no desencadenó la apoptosis de las células HL60-CD99^{hi}.

En conjunto, los datos mostrados en la presente indican que el anticuerpo anti-CD99 humano, Hu12E7-G1, es capaz de inducir fagocitosis y mediar la ADCC, ambos de una manera dependiente de Fc, contra las células objetivo que expresan CD99.

Hu12E7-G1 elimina las células de AML humanas primarias in vivo. Para evaluar la capacidad de nuestros anticuerpos anti-CD99 para eliminar la AML humana primaria *in vivo*, utilizamos un modelo de enfermedad establecido que permite que las células de AML se injerten robustamente en ratones NSG inmunodeficientes antes de comenzar la terapia. Se empleó una estrategia de tratamiento en la que a los ratones se les administraron diariamente inyecciones intraperitoneales de 100 µg de cada uno de los anticuerpos anti-CD99 o un anticuerpo de control durante 2 semanas. Al final de los 14 días, la sangre periférica se reevaluó para el injerto leucémico por citometría de flujo. Tanto el anticuerpo 12E7 de ratón como el 12E7-G1 quimérico mostraron una reducción estadísticamente significativa y marcada en el injerto leucémico en la sangre periférica en comparación con el control (Figura 7A). Estos resultados confirmaron además que las regiones variables del anticuerpo 12E7 que clonamos del

hibridoma de ratón contienen las secuencias de VL y VH correctas. En un segundo experimento de xenotrasplante, se usó Hu12E7-G1 para tratar a los ratones en paralelo con el 12E7-G1 quimérico o el 12E7-G4 quimérico. Al final de los 14 días, la sangre periférica se reevaluó para el injerto leucémico por citometría de flujo. Los tres anticuerpos derivados de 12E7 mostraron una reducción estadísticamente significativa y marcada en el injerto leucémico en la sangre periférica en comparación con el control (Figura 7B). Estos resultados indican que Hu12E7-G1 es eficaz para eliminar las células de AML *in vivo*.

Para probar diferentes muestras de pacientes con AML humana primaria para su respuesta al tratamiento con Hu12E7-G1, injertamos otras dos células de AML humanas primarias independientes en ratones NSG inmunodeficientes. Diez semanas después, se evaluó el injerto de AML en la médula ósea y a los ratones se les asignó tratamiento con IgG de ratón de control o anticuerpo Hu12E7-G1. Los ratones fueron tratados con 14 días de anticuerpo con dosis diarias de 200 µg. Al final de los 14 días, la médula ósea se reevaluó para injerto leucémico por citometría de flujo. Hu12E7-G1 mostró una reducción estadísticamente significativa y marcada en el injerto leucémico en la médula ósea en comparación con el control (Figura 7C). Por lo tanto, Hu12E7-G1 es eficaz en la eliminación de células leucémicas en la sangre periférica y la médula ósea para múltiples muestras de pacientes primarios diferentes.

El anticuerpo monoclonal anti-CD99 sinergiza con el anticuerpo anti-CD47 para eliminar las células de AML humanas primarias in vivo. Anteriormente hemos desarrollado un anticuerpo para CD47 antihumano humanizado denominado Hu5F9-G4. La expresión de CD47 y CD99 aumenta en LSC de AML en comparación con HSC, y los anticuerpos anti-CD47 estimulan potentemente la fagocitosis y la eliminación de LSC de AML *in vitro* e *in vivo*. Además, demostramos que los anticuerpos anti-CD47 pueden sinergizar con los anticuerpos antitumorales que se acoplan eficazmente con los receptores de Fc. Por lo tanto, probamos el efecto del anticuerpo 12E7 en combinación con Hu5F9-G4 contra la AML primaria *in vivo*. Las células AML humanas primarias de dos casos independientes se trasplantaron a ratones NSG inmunodeficientes. 10 semanas después, se evaluó el injerto de AML en la médula ósea y a los ratones se les asignó tratamiento con IgG de ratón de control, anticuerpo anti-CD99 de ratón humano (m12E7), Hu5F9-G4 o combinación de m12E7 y Hu5F9-G4. Los ratones se trataron con 14 días de anticuerpo con dosis diarias de 200 µg de 12E7 o dosis de 10 µg de Hu5F9-G4. Al final de los 14 días, se reevaluó la médula ósea para injerto leucémico por citometría de flujo. De acuerdo con nuestros datos anteriores, Hu5F9-G4 inhibió el crecimiento tumoral en gran medida incluso con dosis de 10 µg. Aunque m12E7 fue menos efectivo en este estudio, el tratamiento de combinación con Hu5F9-G4 mostró una reducción estadísticamente significativa y marcada en el injerto leucémico en la médula ósea en comparación con cualquier anticuerpo solo (Figura 8).

En resumen, nuestros resultados demuestran que nuestros anticuerpos monoclonales anti-CD99 basados en 12E7 son potentes para eliminar las células de AML tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, el efecto de inhibición del tumor mediado por el anticuerpo anti-CD99 sinergiza con el del anticuerpo anti-CD47. Los resultados proporcionan la base científica para el desarrollo de nuevas terapias de anticuerpos dirigidos contra CD99 para la AML.

Materiales y métodos

Clonación y secuenciación del anticuerpo V. La estrategia de clonación usada en la presente implicó un aislamiento de ARN inicial a partir de células de hibridoma de 12E7 (Qiagen). Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 12E7 se obtuvieron usando técnicas 5' RACE-PCR (Clontech) y se secuenciaron usando técnicas de secuenciación de ADN estándar.

Modelado molecular y humanización de anticuerpos. La humanización del anticuerpo 12E7 anti-CD99 de ratón se realizó instalando residuos de CDR del anticuerpo de ratón en el marco (FR) de la línea germinal humana. Las diferencias entre el 12E7 de ratón y los residuos de FR humanos se modelaron individualmente para investigar su posible influencia en la conformación de la CDR. Los genes de VH y VL humanizados fueron sintetizados por McLab (South San Francisco, CA).

Transfección celular. Se cultivaron células 293F en medio de expresión FreeStyle™ 293 (Invitrogen). La transfección transitoria se realizó mediante la co-transfección de vectores de expresión que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo usando el reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuatro a cinco días después, se recogieron los sobrenadantes de las células transfectadas y se analizó la secreción de anticuerpos mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 1 µg/ml de anticuerpo gamma de FC antihumano de cabra en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 16 horas a 4° C. Después de bloquear durante 1 hora con BSA al 0,4% en PBS a temperatura ambiente, se añadieron sobrenadantes aislados en diluciones secuenciales 1/3, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron posteriormente tres veces y se incubaron con anticuerpo específico de kappa anti-humano de cabra conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con OPT. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2M, y OD se midió a 490 nm.

Purificación y caracterización de anticuerpos. El sobrenadante de cultivo se aplicó a columnas de Sepharose de proteína A. La columna se lavó con PBS y luego se eluyó la proteína con tampón de elución (tampón de citrato de sodio 0,1M, pH 3,0). Las fracciones recogidas se neutralizaron con Tris 1 M pH 9,0. Finalmente, las muestras purificadas se dializaron contra PBS. La pureza de la fracción de anticuerpo eluida se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en geles al 10% en condiciones reductoras o no reductoras. Las bandas fueron visualizadas mediante tinción azul brillante de Coomassie.

Ensayo de fagocitosis. La capa leucocítica fresca obtenida del Stanford Blood Center se procesó sobre Ficoll para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se colocaron en placas $1,5 \times 10^6$ PBMC en 10 ml de medio de crecimiento IMDM (IMDM + suero AB humano al 10% + Glutamax + pluma/estreptococo) y se incubaron a 37 grados durante 8 días. En el día 8, los macrófagos humanos se habían desarrollado completamente y se tripsinizaron. Se añadieron 5×10^4 células en 200 μ l de medio de crecimiento IMDM a cada pocillo de una placa de 24 pocillos para la incubación durante la noche para que los macrófagos se uniesen a la placa. Se añadió una concentración final de 10 μ g/ml de 12E7 de ratón, Ch12E7-G1, Ch12E7-G4, Hu12E7-G1 o control de isotipo HulgG1 a placas de 24 pocillos que contienen macrófagos humanos. Las células objetivo (AML primaria o HL60-CD99^{hi}) se marcaron por CFSE. Se añadieron 2×10^5 células objetivo (AML primaria o HL60-CD99^{hi}) en 100 μ l de medio de crecimiento IMDM a cada pocillo, se mezclaron y se incubaron a 37° C durante 2 horas (efector:objetivo = 1:4). El índice de fagocitosis se obtuvo contando el número de células objetivo fagocíticas por 100 células efectoras por microscopía de fluorescencia.

Ensayo de ADCC. El ADCC se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el kit de citotoxicidad por bioluminiscencia aCella-TOX™ (Cell Technology Inc. N° de Cat. CLATOX100-3). Brevemente, se incubaron PBMC humanas durante la noche a 10^6 /ml en medio completo humano IMDM con 400 unidades/ml de IL-2 humana. Al día siguiente, se usaron PBMC activadas como células efectoras. Se añadieron 5×10^3 células HL60-CD99^{hi} en 25 μ l de medio completo humano IMDM por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U, y se añadieron a cada pocillo 25 μ l de medio completo humano IMDM que contenía diferentes anticuerpos a las concentraciones indicadas. Después de 5 minutos de incubación a 37° C, se añadieron $2,5 \times 10^5$ PBMC en 25 μ l de medio completo humano IMDM a cada pocillo para dar una proporción de célula efectora:objetivo (E/T) de 100:1. Luego, las mezclas se incubaron a 37° C durante otras 4 horas, seguido de detección con los reactivos del kit.

Tratamiento de anticuerpos in vivo de ratones injertados con AML humana. Se trasplantaron aproximadamente 1×10^6 células de AML primarias por vía intravenosa en ratones NSG adultos. De diez a doce semanas después, se evaluó el injerto de AML en la médula ósea y la sangre periférica. Los ratones se trataron luego con los anticuerpos indicados durante 14 días. Al final de los 14 días, la médula ósea y la sangre periférica se reevaluó para el injerto leucémico mediante citometría de flujo y se detuvo el tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado aislado que se une específicamente a CD99 humano, y comprende: (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 y (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 5, en donde las cadenas variables se construyen sobre un supercóntigo de IgG1 humana, y en donde la SEQ ID NO. 2 y la SEQ ID NO. 4 son como en la Figura 2 y la SEQ ID NO. 5 es como en la Figura 4.

2. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la reivindicación 1.

3. Una célula que produce un anticuerpo descrito en la reivindicación 1.

4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito en la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. El anticuerpo descrito en la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar el cáncer, en donde el método comprende administrar el anticuerpo a un sujeto en una dosis eficaz para reducir el número de células cancerosas en el sujeto.

6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 5, en donde:

(a) el sujeto es humano, y/o

(b) el método comprende además el paso de coadministrar un agente anti-CD47 al sujeto, y/o

(c) el cáncer es leucemia mieloide aguda.

A.

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK
CDR1 CDR2
 DTYIHWVKRRPEQGLEWIGRIDPANGNTK
 YDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED
CDR3
 TAVYYCARRGGVDWGQGTLVTVSA

B.

CDR1
 DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLD
CDR2
 GDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDS
 GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY
CDR3
 YCWQGGTHFPRTFGGGGTKLEIK

FIGURA 1

A.

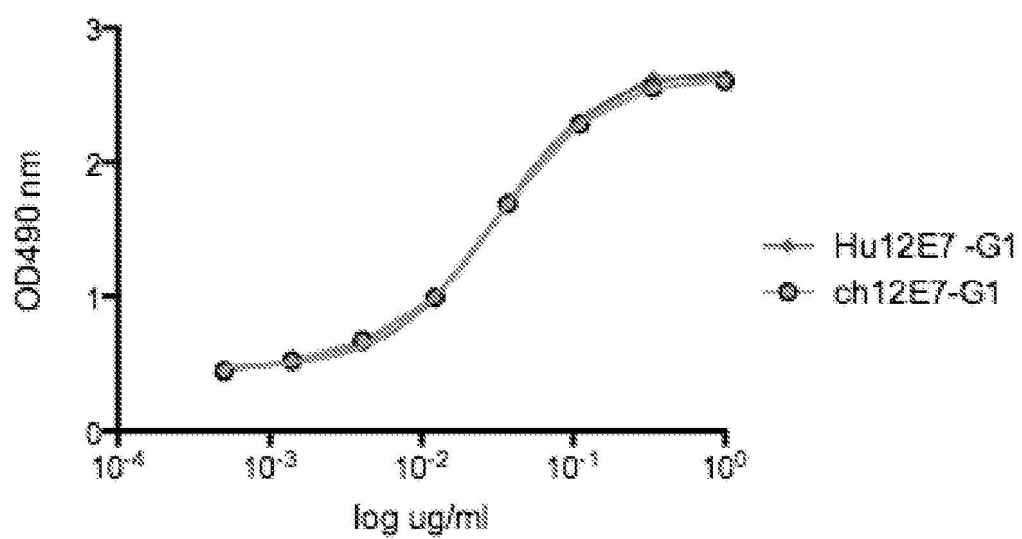
	<u>CDR1</u>
12E7-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIH
Hu12E7-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKDTYIH
	<u>CDR2</u>
12E7-VH	WVKRRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQ GKATI
Hu12E7-VH	WVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNTKYDPKFQGRVTM
	<u>CDR3</u>
12E7-VH	TADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARRGGVDWG
Hu12E7-VH	TRDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARRGGVDWG
12E7-VH	QGTLVTVSA
Hu12E7-VH	QGTLVTVSS

B.

	<u>CDR1</u>
12E7-VL	DVVM TQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLD
Hu12E7-VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLD
	<u>CDR2</u>
12E7-VL	GDGKTYLNWLLQRP GQSPKRLIYLVSKLDSGV
Hu12E7-VL	GDGKTYLNWLLQKPGQSPQR LIYLVSKLDSGV
	<u>CDR3</u>
12E7-VL	PDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLG VYYCWQ
Hu12E7-VL	PDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQ
12E7-VL	GTHFPRTFGGGTKLEIK
Hu12E7-VL	GTHFPRTFGQGTKLEIK

FIGURA 2

A.



B.

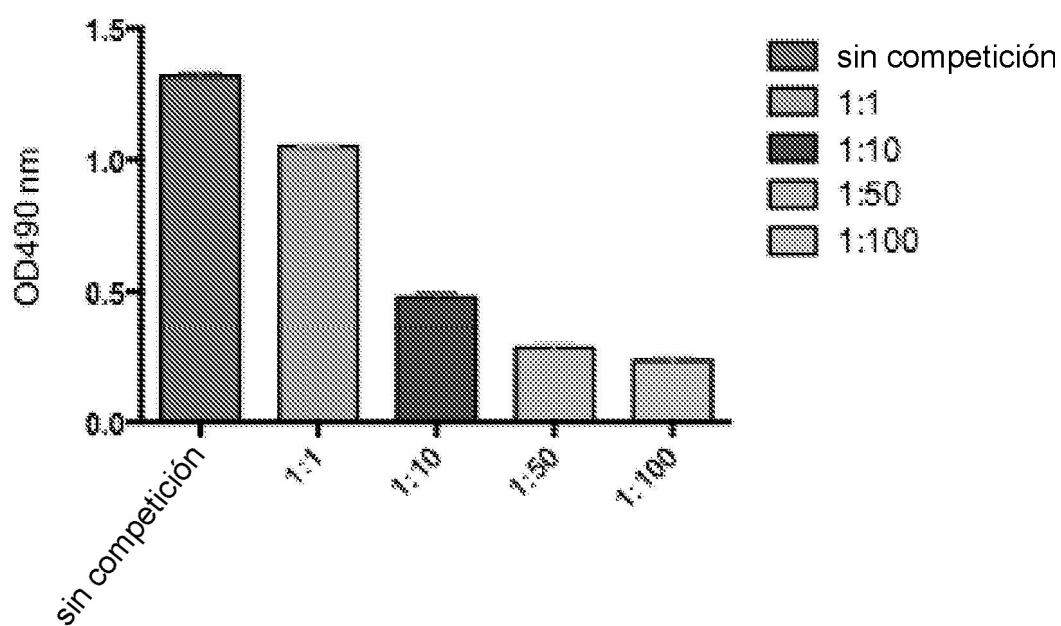


FIGURA 3

A.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNTKY
 DPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARRGGVDWGQGTTLVTVSS

B.

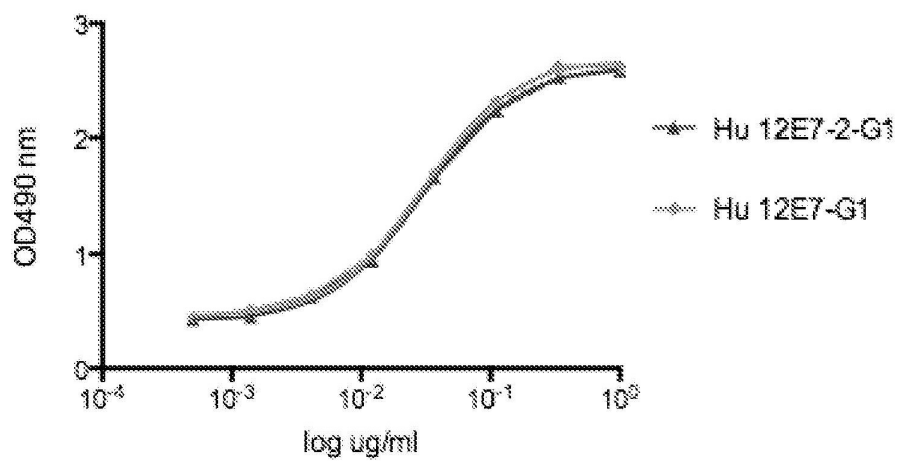
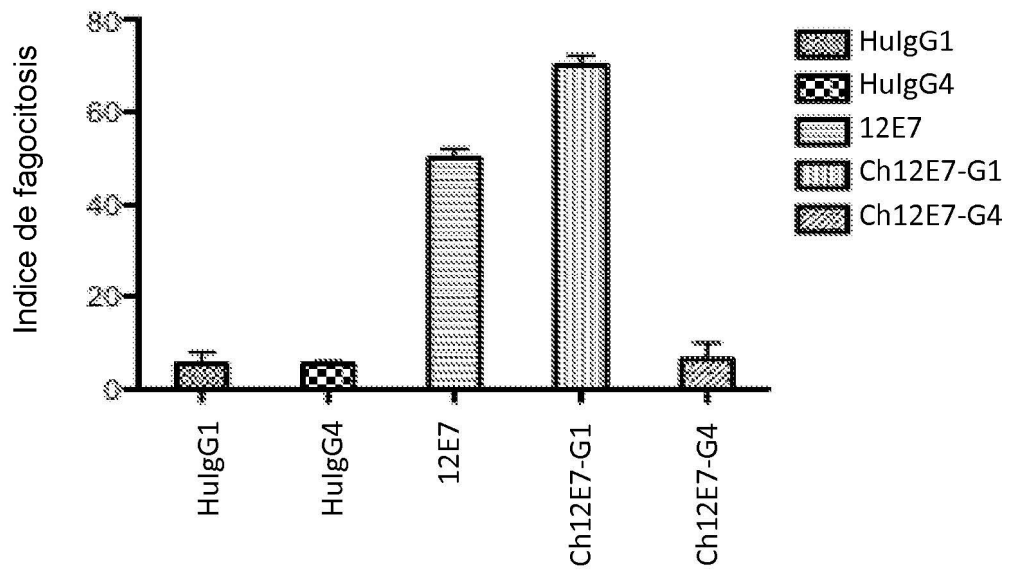


FIGURA 4

A.



B.

Macrófago Humano 10-4-13: AML = 1:4 para Hu12E7-G1

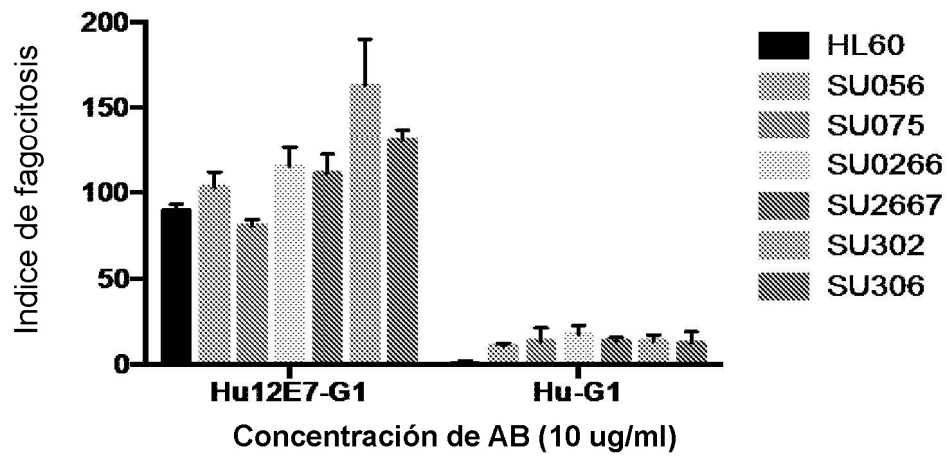


FIGURA 5

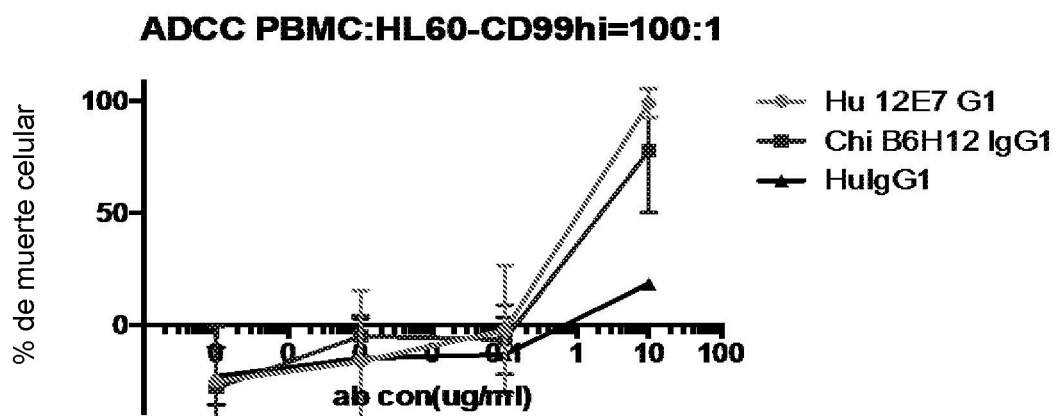
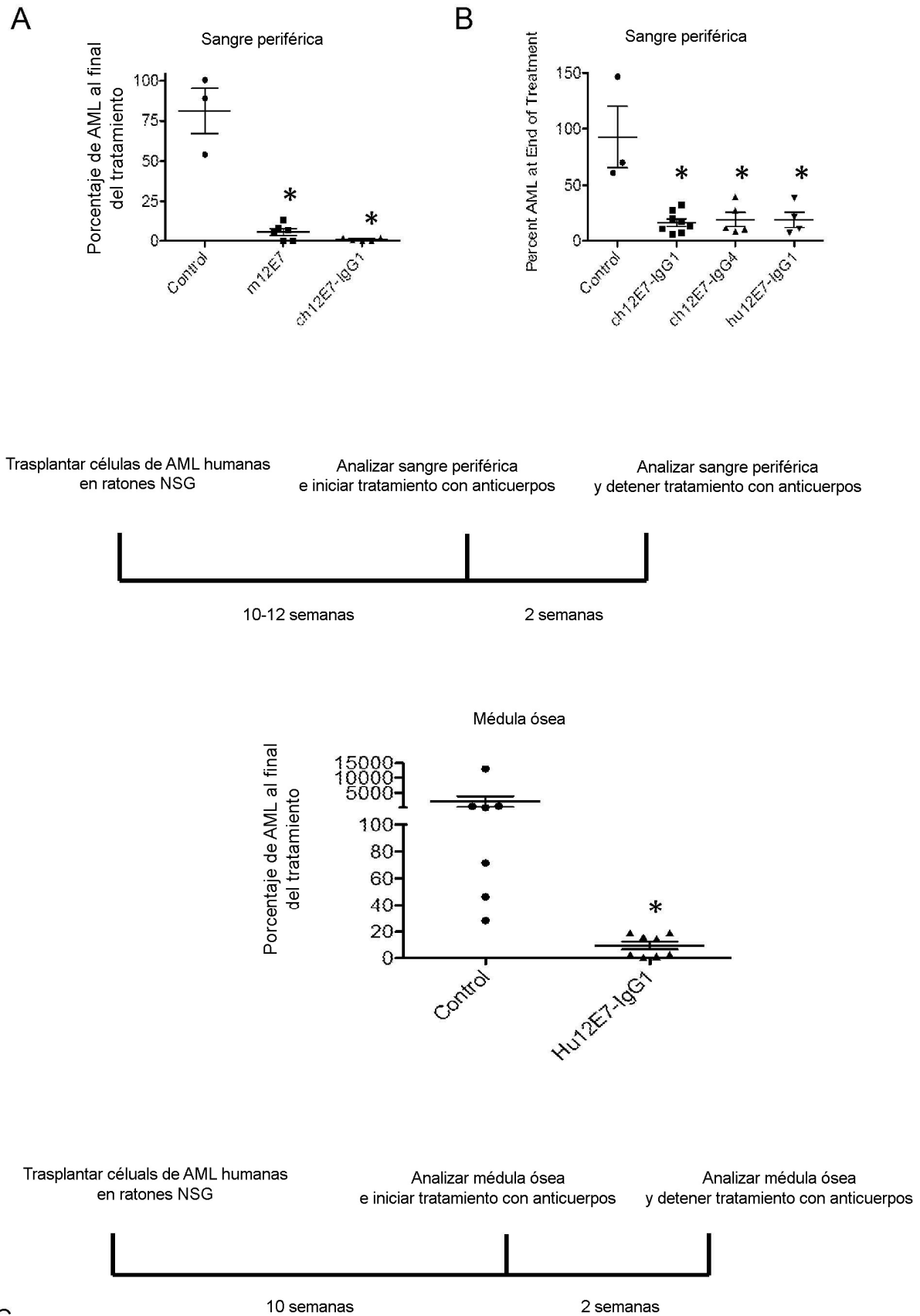


FIGURA 6



C
FIGURA 7

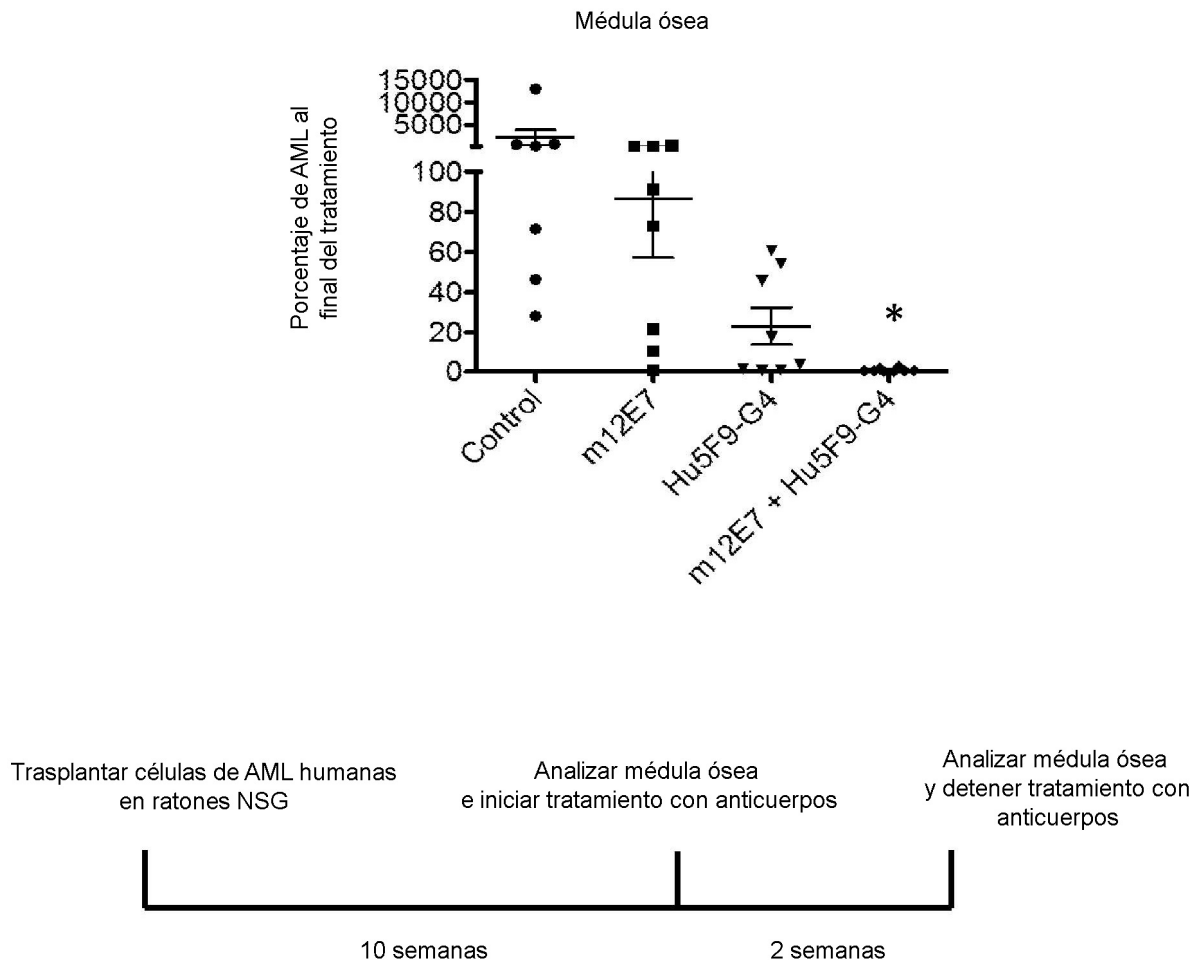


FIGURA 8