



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 333**

51 Int. Cl.:
A61K 6/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01986050 .1**

96 Fecha de presentación : **28.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1347730**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2003**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD30 recombinantes y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **28.11.2000 US 724406**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2010

73 Titular/es: **Seattle Genetics, Inc.**
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, Washington 98021, US

72 Inventor/es: **Francisco, Joseph, A.;**
Risdon, Grant;
Wahl, Alan, F. y
Siegall, Clay, B.

74 Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

ES 2 339 333 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD30 recombinantes y usos de los mismos.

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y a composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, comprendiendo la administración de un anticuerpo que enlaza con CD30. Tales anticuerpos incluyen formas recombinantes/variantes de los anticuerpos monoclonales AC10 y HeFi-1, y derivados de los mismos. Esta invención se refiere a una clase nueva de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor CD30 los cuales, en forma no modificada, son capaces de inhibir el crecimiento de las células de la enfermedad de Hodgkin que expresan CD30.

2. Antecedentes de la invención

Los regímenes de quimioterapia curativa para la enfermedad de Hodgkin representan uno de los avances más importantes en la oncología clínica. Los regímenes de quimioterapia multiagente han aumentado el índice de curación en más de un 80% para estos pacientes. Sin embargo, el 3% de los pacientes mueren por causas relacionadas con el tratamiento, y para los pacientes que no responden a la terapia estándar o recaen después del tratamiento de primera línea, la única modalidad de tratamiento disponible es de dosis altas de quimioterapia en combinación con trasplantes de células madre. Este tratamiento se asocia a un 80% de incidencia de mortalidad, morbilidad significativa y un nivel de supervivencia de cinco años inferior al 50% (véase p. ej., Engert, *et al.*, 1999, *Seminars in Hematology* 36:282-289).

La causa primaria de recaída tumoral es el desarrollo de clones de células tumorales resistentes a los agentes quimioterapéuticos. La inmunoterapia representa una estrategia alternativa que puede evitar potencialmente la resistencia. Los anticuerpos monoclonales para la focalización de células tumorales malignas han sido el foco de varios enfoques inmunoterapéuticos. Para diferentes malignidades, los programas terapéuticos basados en anticuerpos son ahora una parte reconocida de la terapia estándar. El anticuerpo anti-CD20 creado genéticamente Rituxan[®], por ejemplo, se aprobó a finales de 1997 para el tratamiento del NHL recurrente de bajo grado.

CD30 es una glicoproteína de membrana de 120 kilodaltons (Froese *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139: 2081-87) y un elemento de la superfamilia de receptores de TNF. Esta familia incluye TNF-RI, TNF-RII, CD30, CD40, OX-40 y RANK, entre otros.

CD30 es un marcador probado de células malignas en la enfermedad de Hodgkin (HD) y el linfoma de célula grande anaplásico (ALCL), un subconjunto de linfomas diferentes de Hodgkin (NHL) (Dürkop *et al.*, 1992, *Cell* 88:421-427). Originalmente identificado en células cultivadas de Reed Steinberg de Hodgkin (H-RS) usando el anticuerpo monoclonal Ki-1 (Schwab *et al.*, 1982, *Nature* 299:65-67), CD30 se expresa con gran frecuencia en la superficie de la célula de todos los linfomas de HD y de la mayoría de ALCL, aún tiene una expresión muy limitada en tejidos normales para pequeños números de células linfoides en las áreas perifoliculares (Josimovic-Alasevic *et al.*, 1989, *Eur. J. Immunol.* 19:157-162). Anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno CD30 se han explorado como vehículos para la administración de fármacos citostáticos, toxinas de planta y radioisótopos en ambos modelos preclínicos y estudios clínicos (Engert *et al.*, 1990, *Cancer Research* 50:84-88; Barth *et al.*, 2000, *Blood* 95:3909-3914). En pacientes con HD, la focalización del antígeno CD30 podría conseguirse con dosis bajas del mAb anti-CD30, BerH2 (Falini *et al.*, 1992, *British Journal of Haematology* 82:38-45). Aún más, a pesar de la exitosa focalización *in vivo* de las células tumorales malignas, ninguno de los pacientes experimentó regresión tumoral. En una prueba clínica posterior, una toxina (saporin) se conjugó químicamente con el anticuerpo BerH2 y los cuatro pacientes demostraron reducciones rápidas y sustanciales de masa tumoral (Falini *et al.*, 1992, *Lancet* 339: 1195-1196).

Estas observaciones recalcan la validez del receptor CD30 como un antígeno objetivo. No obstante, todos los pacientes tratados con el conjugado de toxina mAb desarrollaron anticuerpos para la toxina. Una de las limitaciones más importante de las inmunotoxinas es su inmunogenicidad inherente que resulta en el desarrollo de anticuerpos para la molécula de la toxina y neutraliza sus efectos (Tsutsumi *et al.*, 2000, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 97:8545-8553). Adicionalmente, la toxicidad del hígado y el síndrome de fuga vascular asociado a las inmunotoxinas limita de forma potencial la capacidad para administrar dosis curativas de estos agentes (Tsutsumi *et al.*, 2000, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 97:8545-8553).

2.1 Anticuerpos monoclonales CD30

El CD30 se identificó originalmente por el anticuerpo monoclonal Ki-1 y se refirió inicialmente como el antígeno Ki-1 (Schwab *et al.*, 1982, *Nature* 299:65-67). Este mAb se desarrolló contra las células de Hodgkin y de Reed Stemberg (H-RS), las células malignas de la enfermedad de Hodgkin (HD). Un segundo mAb, capaz de unir un epítipo resistente a la formalina, diferente del reconocido por Ki-1 se describió posteriormente (Schwartz *et al.*, 1989 *Blood* 74:1678-1689). La identificación de cuatro anticuerpos adicionales resultó en la creación del grupo de CD30 en el Tercer Seminario sobre la Clasificación de Leucocitos (Third Leucocyte Typing Workshop) en 1986 (McMichael, A., ed., 1987, *Leukocyte Typing III* (Oxford: Oxford University Press)).

2.2 Terapias basadas en el anticuerpo monoclonal CD30

La utilidad de los mAbs CD30 en el diagnóstico y la estadificación de la HD llevados a su evaluación como herramientas potenciales para la inmunoterapia. En pacientes con HD, la focalización específica del antígeno CD30 se consiguió con dosis bajas (30-50 mg) del mAb anti-CD30 BerH2 (Falini *et al.*, 1992, British Journal of Haematology 82:38-45). A pesar de la exitosa focalización *in vivo* de las células tumorales malignas H-RS, ninguno de los pacientes experimentó regresiones tumorales.

En base a estos resultados, se concluyó que la eficacia con la inmunoterapia prevista de mAb CD30 no podría conseguirse con anticuerpos inmodificados (Falini *et al.*, 1992, Lancet 339:1195-1196). En una prueba clínica posterior, el tratamiento de cuatro pacientes con HD refractaria con una toxina, saporin, conjugada químicamente al mAb BerH2 demostró reducciones rápidas y sustanciales, aunque transitorias, de masa tumoral (Falini *et al.*, 1992, Lancet 339:1195-1196). En los últimos años, los investigadores han trabajado para refinar los enfoques para tratar las células neoplásicas que expresan el CD30. Ejemplos incluyen el desarrollo de inmunotoxinas de cadena única recombinantes (Bart *et al.*, 2000, Blood 95:3909-3914), mAbs bi-específicos anti CD16/CD30 (Renner *et al.*, 2000, Cancer Immunol. Immunother. 49:173-180), y la identificación de nuevos mAbs anti-CD30 que previenen la liberación de moléculas CD30 de la superficie de la célula (Horn-Lohrens *et al.*, 1995, Int. J. Cancer 60:539-544).

Este enfoque ha descartado el potencial de las mAbs anti-CD30 con actividad de señalización en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

2.3. Identificación de anticuerpos monoclonales anti-CD30 con actividad agonista

En la clonación y caracterización de la actividad biológica del ligando CD30 humano (CD30L), se describieron dos mAbs, M44 y M67, los cuales imitaban la actividad de la reticulación receptora inducida de CD30L (Gruss *et al.*, 1994, Blood 83: 2045-2056). En ensayos *in vitro*, estos mAbs, en su forma inmovilizada, fueron capaces de estimular la proliferación de células T activadas y las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin de origen de células T, L540 y HDLM-2. Por otra parte, estos mAbs tuvieron poco efecto en las líneas celulares de Hodgkin con origen de célula B, L428 y KM-H2 (Gruss *et al.*, 1994, Blood 83:2045-2056). En todos estos ensayos, la unión del receptor de CD30 por el mAb anti-CD30 Ki-1 tuvo poco efecto.

La actividad proliferativa de estos mAbs anti-CD30 agonistas en las líneas celulares de Hodgkin sugirió que las mAbs anti-CD30 que poseen actividad de señalización no tendrían ninguna utilidad en el tratamiento de HD.

Por otra parte, se ha mostrado recientemente que los mAbs anti-CD30 pueden inhibir el crecimiento de las células ALCL, incluyendo Karpas-299, induciendo a la detención del ciclo celular y no induciendo a la apoptosis (Hubinger *et al.*, 2001, Oncogene 20: 590-598). Además, la presencia de los mAbs M44 y M67 inmovilizados inhibe fuertemente la proliferación de las líneas celulares que representan el ALCL que expresa CD30 (Gruss *et al.*, 1994, Blood 83:2045-2056). Esta actividad inhibitoria contra las líneas celulares del ALCL pasó a formar parte de estudios en animales *in vivo*. La supervivencia del ratón SCID portando xenotransplantes tumorales de ALCL aumentó significativamente tras la administración del mAb M44. Además, el mAb HeFi-1 anti-CD30, reconociendo un epítipo similar al de M44, también prolongaba la supervivencia en este modelo de animal (Tian *et al.*, 1995, Cancer Research 55:5335-5341).

2.3.1 Anticuerpo monoclonal AC10

La mayoría de mAbs anti-CD30 de murina conocidos en la técnica se han generado por inmunización de ratones con líneas celulares de HD o antígeno CD30 purificado. El AC10, originalmente denominado como C10 (Bowen *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:5896-5906), es diferente por el hecho de que este mAb anti CD30 que se preparó contra una línea celular humana de tipo NK, YT (Bowen *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:5896-5906). Inicialmente, la actividad de señalización de este mAb se averiguó mediante la regulación a la baja de la expresión de la superficie celular de las moléculas CD28 y CD45, la regulación a la alta de la superficie celular de la expresión CD25 y la inducción a una unión homotípica seguida de la adhesión de C10 a células YT.

2.3.2 Anticuerpo monoclonal HeFi-1

HeFi-1 es un mAb anti-CD30 que se produjo inmunizando ratones con la línea celular de la enfermedad de Hodgkin L428 (Hecht *et al.*, 1985, J. Immunol. 134:4231-4236). El cocultivo de HeFi-1 con las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin L428 o L540 no consiguió revelar efecto directo alguno del mAb en la viabilidad de estas líneas celulares. La actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de HeFi-1 se describió por Tian *et al* contra la línea celular de ALCL Karpas 299 (Tian *et al.*, 1995, Cancer Research 55:5335-5341).

2.4 Actividad directa antitumoral de señalización de los anticuerpos CD30

Los anticuerpos monoclonales representan un enfoque atractivo para focalizar poblaciones específicas de células *in vivo*. Los mAbs nativos y sus derivados pueden eliminar células tumorales mediante varios mecanismos incluyendo, pero no limitándose a, la activación de complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la inhibición de la progresión del ciclo celular y la inducción a la apoptosis (Tutt *et al.*, 1998, J. Immunol. 161:3176-3185).

Como se ha descrito anteriormente, los mAbs para el antígeno CD30 tales como Ki-1 y Ber-H2 no consiguieron demostrar actividad antitumoral directa (Falini *et al.*, 1992, *British Journal of Haematology* 82:38-45; Gruss *et al.*, 1994, *Blood* 83:2045-2056). Mientras que algunos mAbs de señalización para CD30, incluyendo M44, M67 y HeFi-1, han demostrado inhibir el crecimiento de las líneas ALCL *in vitro* (Gruss *et al.*, 1994, *Blood* 83:2045-2056) o *in vivo* (Tian *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:5335-5341), los anticuerpos anti-CD30 conocidos no han demostrado ser eficaces en la inhibición de la proliferación de células de HD en cultivo. De hecho, dos mAbs de señalización anti-CD30, M44 y M67, que inhibieron el crecimiento de la línea de ALCL Karpas-299, mostraron realzar la proliferación de líneas de HD de tipo células T *in vitro* mientras que no mostraron ningún efecto en líneas de HD de tipo célula B (Gruss *et al.*, 1994, *Blood* 83:2045-2056).

El conjugado del anticuerpo Ki-1 con la cadena A de Ricina conllevó más bien a una inmunotoxina inefectiva y se concluyó que esta inefectividad se debía más bien a la baja afinidad del anticuerpo Ki-1 (Engert *et al.*, 1990, *Cancer Research* 50:84-88). Otras dos cuestiones también pueden explicar la toxicidad débil de los conjugados de cadena A Ki-1-Ricina: a) el anticuerpo Ki-1 mejora la liberación del sCD30 de las líneas celulares derivadas de Hodgkin L428 y L540 al igual que de la línea celular de un linfoma diferente al de Hodgkin CD30+ Karpas 299 (Hansen *et al.*, 1991, *Immunobiol.* 183:214); b) la distancia relativamente grande del epítipo Ki-1 de la membrana celular tampoco es favorable para la construcción de inmunotoxinas potentes (Press *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:4410-4417; May *et al.*, 1990, *J. Immunol.* 144:3637-3642).

La publicación PCT WO 96/22384 describe un anticuerpo que se enlaza al antígeno CD30 y a) libera sCD30 a partir de células de la enfermedad de Hodgkin en una cantidad de, o menor de, el 10% y b) no enlaza con la célula B de un linfoma diferente al de Hodgkin o con células de plasma en una extensión considerable y es útil para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

En el Cuarto Seminario sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos en Viena en febrero de 1989, los anticuerpos monoclonales se sometieron por tres laboratorios diferentes y finalmente se caracterizaron como pertenecientes al grupo CD30. Los experimentos de cocultivo por los inventores de las células L540 con diferentes anticuerpos según el nivel de la técnica, seguidos del aislamiento de sCD30 a partir de fluidos sobrenadantes del cultivo, revelaron que la liberación del sCD30 se aumentó más fuertemente por el anticuerpo Ki-1, y se mejoró débilmente por el anticuerpo HeFi-1, mientras que a la vez se inhibe más fuertemente por el anticuerpo Ber-H2. Sin embargo, el anticuerpo Ber-H2 también categoriza una sub-población de células de plasma (Schwartz *et al.*, 1988, *Blood* 74:1678-1689) y G. Pallesen (G. Pallesen, 1990, *Histopathology* 16:409-413) describe, en la página 411, que Ber-H2 reacciona en cruce con un epítipo de un antígeno no relacionado el cual se altera por formaldehído.

Existe una necesidad en la técnica de terapia con eficacia aumentada para tratar o prevenir la enfermedad de Hodgkin, una necesidad proporcionada por la presente invención. Procesos clínicos y numerosas evaluaciones preclínicas no han conseguido demostrar actividad tumoral de ciertos mAbs anti-CD30 en forma inmodificada contra células representativas de la enfermedad de Hodgkin. Bajo condiciones similares a aquellas utilizadas por Gruss *et al.* en sus evaluaciones de los mAbs Ki-1, M44 y M67 (Gruss *et al.*, 1994, *Blood* 83:2045-2056), los inventores presentes demuestran una clase de mAbs de CD30 funcionalmente diferente a la previamente descrita. Esta clase de mAbs anti-CD30 es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de todas las líneas de Hodgkin evaluadas. Además, estos mAbs no modificados poseen actividad antitumoral *in vivo* contra xenotransplantes tumorales de HD.

La citación o identificación de cualquier referencia aquí no debe interpretarse como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

3. Resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de una actividad nueva asociada a una clase determinada de anticuerpos anti-CD30, comprendiendo dicha clase AC10 y HeFi-1, incluyendo su capacidad para inhibir el crecimiento de las células de la enfermedad de Hodgkin (HD) de tipo T y de tipo B.

La presente invención proporciona un anticuerpo que enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30 y (II) el mismo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, donde dicho anticuerpo ejerce el efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente, para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin que comprende:

- a) un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico que se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30, (ii) el mismo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de la conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente, en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin; y
- b) un portador aceptable farmacéuticamente.

ES 2 339 333 T3

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo que se enlaza (i) inmunoespecíficamente a CD30 y (ii) el mismo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, donde dicho anticuerpo ejerce el efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente, en la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

También se describe un método para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin en un sujeto comprendiendo la administración al sujeto, en una cantidad eficaz para dicho tratamiento o prevención, de un anticuerpo que se enlaza inmunoespecíficamente a CD30 y ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, donde dicho anticuerpo ejerce el efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente; y un portador farmacéuticamente aceptable. También se describe un método para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin en un sujeto comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad de una proteína, la cual compite por enlazarse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1, y ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, cuya cantidad es eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención se conjuga a una molécula citotóxica. En otra forma de realización, un anticuerpo de la invención es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de una segunda proteína tal como briedina o una enzima de conversión a un profármaco. Los anticuerpos de la invención, incluyendo conjugados y proteínas de fusión, pueden usarse conjuntamente con terapia de radiación, quimioterapia, terapia hormonal y/o inmunoterapia.

La presente invención comprende además un anticuerpo que se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30, (ii) ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, y (iii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1 y no resulta del clivaje de AC10 o HeFi-1 con papaina o pepsina. El anticuerpo puede ejercer un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente.

La presente invención comprende además un anticuerpo comprendiendo la SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, SEC ID NO: 8, SEC ID NO:12, SEC ID NO:14 o SEC ID NO:16, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30, y (ii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 y no resulta del clivaje de AC10 con papaina o pepsina.

La presente invención comprende además un anticuerpo comprendiendo la SEC ID NO:20, SEC ID NO:22, SEC ID NO:24, SEC ID NO:28, SEC ID NO:30 o SEC ID NO:32, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30, y (ii) no es el anticuerpo monoclonal HeFi-1 y no resulta del clivaje de HeFi-1 con papaina o pepsina.

La presente invención comprende además un anticuerpo comprendiendo una secuencia de aminoácidos con al menos un 95% de identidad con la SEC ID NO:2 o la SEC ID NO:10, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente a CD30; y (ii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 y no resulta del clivaje de AC10 con papaina o pepsina.

La presente invención comprende además un anticuerpo comprendiendo una secuencia de aminoácidos con al menos un 95% de identidad con la SEC ID NO: 18 o la SEC ID NO:26, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente a CD30; y (ii) no es el anticuerpo monoclonal HeFi-1 y no resulta del clivaje de HeFi-1 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin.

La presente invención comprende además una composición farmacéutica comprendiendo (a) un anticuerpo que se enlaza (i) inmunoespecíficamente a CD30, (ii) ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, y (iii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1 y no resulta del clivaje de AC10 o HeFi-1 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo puede ejercer un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente.

La presente invención comprende además una composición farmacéutica que comprende (a) una proteína, cuya proteína (i) compite por enlazarse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1, (ii) ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, y (iii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1 y no resulta del clivaje de AC10 o HeFi-1 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención comprende además una composición farmacéutica comprendiendo (a) una proteína que comprende la SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, SEC ID NO:8, SEC ID NO:12, SEC ID NO:14 o SEC ID NO: 16, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30, y (ii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 y no resulta del clivaje de AC10 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención comprende además una composición farmacéutica que comprende (a) una proteína comprendiendo la SEC ID NO:20, SEC ID NO:22, SEC ID NO:24, SEC ID NO:28, SEC ID NO:30 o SEC ID NO:32, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30, y (ii) no es el anticuerpo monoclonal HeFi-1 y no resulta del clivaje de HeFi-1 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención comprende además una composición farmacéutica que comprende (a) una proteína comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID NO:2 o la SEC ID NO: 10, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30; y (ii) no es el anticuerpo monoclonal AC10 y no resulta del clivaje de AC10 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención comprende además una composición farmacéutica que comprende: (a) una proteína comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID NO: 18 o la SEC ID NO:26, cuya proteína se enlaza (i) inmunoespecíficamente con CD30; y (ii) no es el anticuerpo monoclonal HeFi-1 y no resulta del clivaje de HeFi-1 con papaina o pepsina, en una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización preferida, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En otra forma de realización preferida más, el anticuerpo es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de una segunda proteína que no es un anticuerpo.

A la hora de determinar el efecto citostático de los anticuerpos, de la invención en las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin, un cultivo de la línea celular de la enfermedad de Hodgkin se pone en contacto con la proteína, siendo dicho cultivo de aproximadamente 5.000 células en un área de cultivo de aproximadamente 0,33 cm², el mismo poniéndose en contacto durante un periodo de 72 horas; expuesto a 0,5 μCi de ³H-timidina durante las 8 horas finales de dicho periodo de 72 horas; y se mide la incorporación de ³H-timidina en células del cultivo. El anticuerpo tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular de la enfermedad de Hodgkin cultivada bajo las mismas condiciones pero no estando en contacto con el anticuerpo. Líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin adecuadas para determinar los efectos citostáticos o citotóxicos de los anticuerpos de la invención son L428; L450, HDLM2 o KM-H2.

El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo recombinante, y de la forma más preferible es humano, humanizado, o quimérico.

También se describen ácidos nucleicos aislados codificando una proteína, incluyendo pero no limitándose a un anticuerpo, que compite por enlazarse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1, y ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin. También se describen métodos para aislar ácidos nucleicos codificando anticuerpos que se enlazan inmunoespecíficamente con CD30 y ejercen un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin. También se describen las proteínas codificadas por cualquiera de los ácidos nucleicos precedentes.

También se describe un método para producir una proteína comprendiendo desarrollar una célula conteniendo una secuencia de nucleótidos recombinante codificando una proteína, cuya proteína compite por enlazarse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1 y ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, de manera que la proteína se expresa por la célula; y recuperando la proteína expresada.

También se describe un método para identificar un anticuerpo anti-CD30 útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin, comprendiendo determinar si el anticuerpo anti-CD30 ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin poniendo en contacto un cultivo de la línea celular de la enfermedad de Hodgkin con la proteína, dicho cultivo siendo de aproximadamente 5.000 células en un área de cultivo de aproximadamente 0,33 cm², dicho contacto teniendo un periodo de 72 horas; exponiendo el cultivo a 0,5 μCi de ³H-timidina durante las 8 horas finales de dicho periodo de 72 horas; y midiendo la incorporación de ³H-timidina en células del cultivo. El anticuerpo anti-CD30 tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin y es útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular de la enfermedad de Hodgkin cultivadas bajo las mismas condiciones pero no habiendo estado en contacto con el anticuerpo anti-CD30.

4. Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Inhibición del crecimiento de líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin: las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin HDLM-2, L540, L428 y KM-H2 se cultivaron a 5x10⁴ células/pocillo en presencia o en ausencia de 10 μg/ml de AC10 inmovilizado. Se usó Ki-1 como un control en estos ensayos. La proliferación se midió mediante la incorporación de ³H-timidina tras 72 horas de cultivo.

Fig. 2. Inhibición del crecimiento de líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin: las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin HDLM-2, L540, L428 y KM-H2 se cultivaron a 5x10³ células/pocillo en presencia o en ausencia de 10 μg/ml de AC10 inmovilizado. Se usó Ki-1 como un control en estos ensayos. La proliferación se midió mediante la incorporación de ³H-timidina tras 72 horas de cultivo.

ES 2 339 333 T3

Fig. 3. Inhibición del crecimiento de líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin: las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin HDLM-2, L540, L428 y KM-H2 se cultivaron en 5×10^4 células/pocillo en presencia o en ausencia de $0,1 \mu\text{g/ml}$ AC10 o HeFi-1 que se había reticulado por la adición de $20 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratón. La proliferación se midió mediante la incorporación de ^3H -timidina pasadas las 72 horas de cultivo.

Fig. 4. Inhibición del crecimiento de líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin: las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin HDLM-2, L540, L428 y KM-H2 se cultivaron en 5×10^3 células/pocillo en presencia o en ausencia de $0,1 \mu\text{g/ml}$ de AC10 o HeFi-1 que se había reticulado mediante la adición de $20 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratón. La proliferación se midió mediante la incorporación de ^3H -timidina pasadas las 72 horas de cultivo.

Fig. 5. Actividad tumoral de AC10 (círculos) y HeFi-1 (cuadrados) en xenotransplantes de la enfermedad de Hodgkin de L540cy diseminados (A) y subcutáneos (B). A) Se implantaron 1×10^7 células en ratones a través de la vena caudal el día 0 y se les pusieron inyecciones intraperitoneales de anticuerpo en $1 \text{ mg/kg/inyección}$ usando un horario de administración de q2dx10. B) Se implantaron subcutáneamente 2×10^7 de células L540cy en ratones. Cuando los tumores eran palpables los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales de AC10 o HeFi-1 en $2 \text{ mg/kg/inyección}$ de q2dx10. En ambos experimentos los ratones no tratados (X) no recibieron terapia.

Fig. 6. Vector de expresión quimérico AC10. El ADN codificando la región variable de cadena pesada (Vp) del mAb AC10 se unió a la secuencia codificando la región constante de la gamma humana 1, y la región variable de cadena ligera (LV) AC10 se unió de forma similar a la región constante de la kappa humana en diferentes vectores de clonación. Las secuencias quiméricas de cadena pesada y ligera se clonaron en el plásmido pDEF14 para la expresión del anticuerpo monoclonal quimérico intacto en células CHO. pDEF14 utiliza el promotor del gen alfa 1 del factor de alargamiento del Hámster chino que conduce la transcripción de genes heterólogos (Patente U.S. n°. 5.888.809).

Fig. 7. Saturación de unión de AC10 y de AC10 quimérico (cAC10) para Karpas-299 positivo de CD30. Se combinaron células con concentraciones en aumento de AC10 o cAC10 durante 20 minutos, se lavaron con un 2% de PBS/PBS (medios de coloración) para eliminar el mAb libre y se incubaron con anticuerpos de cabra anti FITC de ratón o con anticuerpos de cabra anti FITC humano, respectivamente. Las células marcadas se lavaron otra vez con medios de coloración y se examinaron mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia medias resultantes se fijaron con respecto a la concentración de mAb como se describe en la sección 9.1.

Fig 8. Inhibición del crecimiento *in vitro* mediante AC10 quimérico (cAC10). Las líneas CD30 positivas y la línea CD30 negativa HL-60 se colocaron en placas de 5.000 células/pocillo. Se añadió AC10 quimérico en las concentraciones registradas en presencia de un exceso multiplicado por 10 correspondiente de anticuerpo de cabra anti-IgG humano. La inhibición porcentual relativa a pocillos de control no tratados se fijó en relación a la concentración de cAC10.

Fig. 9. Efectos cíclicos celulares de AC10 quimérico en células de HD L540cy. Las células se trataron con 1 pg/ml de cAC10 y 10 pg/ml de anticuerpo secundario de cabra anti-humano. En los momentos en que las células indicadas se marcaron con BrdU, se permeabilizaron y se mancharon con anti-BrdU para detectar la síntesis de ADN naciente (panel inferior), y se mancharon con yodina de propidio para detectar el contenido de ADN total (panel superior). De los paneles superiores, el perfil G_1 , la fase S y el contenido de G_2 manchando mediante P1 y los paneles inferiores muestran contenido y síntesis de ADN según se detecta mediante la incorporación de BrdU. Las regiones 2, 5 y 3 designan G_1 , la fase S y G_2 respectivamente. La región 4, conteniendo ADN del sub-contenido de G_2 no experimenta una síntesis de ADN y la región 6, el ADN del sub-contenido de G_1 , indica células con fragmentación de ADN apoptótico (Donaldson *et al.*, 1997, J. Immunol. Meth. 203:25-33).

Fig 10. Eficacia del AC10 quimérico en modelos de HD. La (A) actividad antitumoral de cAC10 en L540cy diseminado de la enfermedad de Hodgkin en ratones SCID. Grupos de ratones (cinco/grupo) o bien quedaron sin tratarse (X) o recibieron 1 (\square), 2, (Δ) o 4 (\bullet) mg/kg de cAC10 (q4dx5) desde el día 1 después de la inoculación tumoral. (B) El L540cy diseminado de la enfermedad de Hodgkin en ratones SCID donde grupos de ratones (cinco/grupo) o bien quedaron sin tratarse (X) o recibieron terapia iniciada o bien el día 1 (\square), el día 5 (Δ), o el día 9 (\bullet) por cAC10 administrado en 4 mg/kg usando una planificación de q4dx5. (C) Modelo tumoral subcutáneo L540cy de HD en ratones SCID. A los ratones se les implantaron 2×10^7 células de L540cy de la enfermedad de Hodgkin en el lado adecuado. Grupos de ratones (cinco/grupo) o bien quedaron sin tratarse (X) o recibieron 1 (\square), 2, (Δ) o 4 (\bullet) mg/kg de AC10 quimérico (q4dx5; \blacktriangle) empezando cuando el tamaño tumoral en cada grupo de 5 animales tenía un promedio de $\sim 50 \text{ mm}^3$.

Fig. 11. Actividad antitumoral de AC10 quimérico (cACO) en xenotransplantes subcutáneos de L540cy de la enfermedad de Hodgkin. A los ratones SCID se les implantaron subcutáneamente células de L540cy y cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de $>150 \text{ mm}^3$ los ratones o bien quedaron sin tratarse (X) o se trataron con cAC10 (\square) en 2 mg/kg dos veces por semana mediante 5 inyecciones.

Fig. 12. Administración de AEB a células positivas CD30 a través de AC10 quimérico. Las células de las líneas celulares indicadas se expusieron al AC10 quimérico conjugado al agente citotóxico AEB, un derivado de auristatin E

ES 2 339 333 T3

(el conjugado se describe en la solicitud U.S. n°. 09/845,786 solicitada el 30 de abril de 2001). La viabilidad celular en porcentaje de control se fija sobre la concentración del conjugado de fármaco cAC10 que se administró.

Fig. 13. Actividad de conjugado de AC10-AEB quimérico en ratones portadores de xenotransplantes de la enfermedad de Hodgkin de L540cy. A los ratones se les implantaron células de L540cy subcutáneamente. AC10 quimérico conjugado al agente citotóxico AEB, un derivado de auristatin E, se administró en dosis indicadas con un total de 4 dosis en intervalos de 40 días. El volumen tumoral en mm³ se fija durante días después de la implantación tumoral.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que enlazan con CD30 y ejercen un efecto citostático o citotóxico en células de HD. La invención se refiere además a anticuerpos que compiten con AC 10 o HeFi-1 por enlazarse con CD30 y ejercen un efecto citostático o citotóxico en células de HD. En una forma de realización preferida, el anticuerpo es AC10 o HeFi-1, de la forma más preferible un AC10 o HeFi-1 humanizado o quimérico.

La invención también se refiere a anticuerpos codificados por y a secuencias de nucleótidos de genes AC10 y HeFi-1. La invención se refiere además a fragmentos y otros derivados y análogos de tales anticuerpos AC10 y HeFi-1. También se describen ácidos nucleicos codificando tales fragmentos o derivados. La producción de los anticuerpos anteriormente descritos, p. ej., por métodos recombinantes, está descrita.

La invención también se refiere a anticuerpos AC10 y HeFi-1 y derivados incluyendo anticuerpos de fusión/quiméricos funcionalmente activos, es decir, capaces de mostrar un enlace con CD30 y ejercer un efecto citostático o citotóxico en células de HD.

Los anticuerpos para CD30 comprendidos por la invención incluyen anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados, y anticuerpos de este tipo conjugados a agentes citotóxicos tales como fármacos quimioterapéuticos.

También se describen métodos para tratar o prevenir la HD comprendiendo la administración de una composición comprendiendo una proteína o ácido nucleico sólo o en combinación con un agente citotóxico, incluyendo pero no limitándose a un fármaco quimioterapéutico.

Para clarificar la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que siguen.

5.1 Anticuerpos de la invención

La presente invención comprende anticuerpos que enlazan con CD30 y ejercen efectos citostáticos y/o citotóxicos en células HD. La invención también se refiere a anticuerpos que compiten con AC10 o HeFi-1 para enlazarse con CD30 y ejercer un efecto citostático o citotóxico en células de HD.

La presente invención comprende además anticuerpos que comprenden, o de forma alternativa que consisten en, un CDR de HeFi-1 (SEC ID NO:20, SEC ID NO:22, SEC ID NO:24, SEC ID NO:28, SEC ID NO:30 o SEC ID NO:32) o AC10 (SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, SEC ID NO:8, SEC ID NO: 12, SEC ID NO:14, o SEC ID NO:16).

La presente invención comprende además anticuerpos que comprenden, o de forma alternativa que consisten en, una región variable de HeFi-1 (SEC ID NO:18 o SEC ID NO:26) o AC10 (SEC ID NO:2 o SEC ID NO: 10). Abajo se proporciona una tabla que indica la región de AC10 o HeFi-1 a la que cada SEC ID n° corresponde:

TABLA 1

MOLÉCULA	NUCLEOTIDO O AMINOÁCIDO	SEC ID NO
Region Variable de cadena pesada de AC10	Nucleótido	1
Region Variable de cadena pesada de AC10	Aminoácido	2
CDR1(H1) de cadena pesada de AC10	Nucleótido	3
CDR1(H1) de cadena pesada de AC 10	Aminoácido	4
CDR2(H2) de cadena pesada de AC 10	Nucleótido	5
CDR2(H2) de cadena pesada de AC 10	Aminoácido	6
CDR3(H3) de cadena pesada de AC 10	Nucleótido	7
CDR3(H3) de cadena pesada de AC 10	Aminoácido	8

ES 2 339 333 T3

	Region Variable de cadena ligera de AC 10	Nucleótido	9
5	Region Variable de cadena ligera de AC 10	Aminoácido	10
	CDR1(L1) de cadena ligera de AC10	Nucleótido	11
10	CDR1(L1) de cadena ligera de AC10	Aminoácido	12
	CDR2(L2) de cadena ligera de AC10	Nucleótido	13
15	CDR2(L2) de cadena ligera de AC10	Aminoácido	14
	CDR3(L3) de cadena ligera de AC10	Nucleótido	15
	CDR3(L3) de cadena ligera de AC10	Aminoácido	16
20	Region Variable de cadena pesada de HeFi-1	Nucleótido	17
	Region Variable de cadena pesada de HeFi-1	Aminoácido	18
25	CDR1(H1) de cadena pesada de HeFi-1	Nucleótido	19
	CDR1(H1) de cadena pesada de HeFi-1	Aminoácido	20
30	CDR2(H2) de cadena pesada de HeFi-1	Nucleótido	21
35	CDR2(H2) de cadena pesada de HeFi-1	Aminoácido	22
	CDR3(H3) de cadena pesada de HeFi-1	Nucleótido	23
40	CDR3(H3) de cadena pesada de HeFi-1	Aminoácido	24
45	Region Variable de cadena ligera de HeFi-1	Nucleótido	25
	Region Variable de cadena ligera de HeFi-1	Aminoácido	26
50	CDR1(L1) de cadena ligera de HeFi-1	Nucleótido	27
	CDR1(L1) de cadena ligera de HeFi-1	Aminoácido	28
55	CDR2(L2) de cadena ligera de HeFi-1	Nucleótido	29
	CDR2(L2) de cadena ligera de HeFi-1	Aminoácido	30
60	CDR3(L3) de cadena ligera de HeFi-1	Nucleótido	31
	CDR3(L3) de cadena ligera de HeFi-1	Aminoácido	32

65

ES 2 339 333 T3

La presente invención además comprende derivados funcionales o análogos de AC10 y HeFi-1. Como se utiliza en este caso, el término “funcional” en el contexto de un anticuerpo de la invención indica que el anticuerpo es 1) capaz de enlazarse con CD30 y 2) ejerce un efecto citostático y/o citotóxico en células de HD.

5 Generalmente, los anticuerpos de la invención se enlazan inmunoespecíficamente con CD30 y ejercen efectos citostáticos y citotóxicos en células malignas en la HD. Los anticuerpos de la invención son preferiblemente monoclonales, y pueden ser anticuerpos multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab’), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y fragmentos de enlace de CD30 de cualquiera de los de arriba. El término “anticuerpo”, como se usa aquí, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión del antígeno que se enlaza inmunoespecíficamente con CD30. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y Igi), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

15 En determinadas formas de realización de la invención, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo humano de unión de antígenos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab’ y F(ab’)₂, Fd, FVs monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, FVs enlazado de disulfuro (sdFv) y fragmentos comprendiendo un dominio o bien VL o VH. Fragmentos de anticuerpo de unión de antígenos, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región de articulación, dominios CH1, CH2, CH3 y CL. También se incluyen en la invención fragmentos de unión de antígenos comprendiendo también cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región de articulación, dominios CH1, CH2, CH3 y CL. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, de murina (p. ej., ratón y rata), asno, oveja, conejo, cabra, cobaya, camélido, caballo, o pollo. Como se utiliza aquí, los anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos teniendo la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana, a partir de células B humanas, o a partir de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, como se describe abajo y, por ejemplo en la patente estadounidense n°. 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos o de multiespecificidad superior. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para epítopos diferentes de CD30 o pueden ser específicos tanto para CD30 como para una proteína heteróloga. Véase, p. ej., las publicaciones PCT WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, WO 92/05793; Tutt, *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; patentes U.S. Nos. 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, 5.601.819; Kostelni *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

35 Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en cuanto a los CDRs particulares que estos comprenden. En determinadas formas de realización los anticuerpos de la invención comprenden uno o más CDRs de AC10 y/o HeFi-1. La invención comprende un anticuerpo o derivado del mismo comprendiendo un dominio variable de cadena pesada o ligera, comprendiendo dicho dominio variable (a) un conjunto de tres CDRs, en el cual dicho conjunto de CDRs es del anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1, y (b) un conjunto de cuatro regiones de armazón, en cuyo conjunto de regiones de armazón se difiere del conjunto de regiones de armazón en el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1, respectivamente, y en el cual dicho anticuerpo o derivado del mismo se enlaza inmunoespecíficamente con CD30.

45 En una forma de realización específica, la invención comprende un anticuerpo o derivado del mismo comprendiendo un dominio variable de cadena pesada, comprendiendo dicho dominio variable (a) un conjunto de tres CDRs, en el cual dicho conjunto de CDRs comprende las SEC ID NO:4, 6, ó 8 y (b) un conjunto de cuatro regiones de armazón, en el cual dicho conjunto de regiones de armazón se difiere del conjunto de regiones de armazón en el anticuerpo monoclonal AC10, y en el cual dicho anticuerpo o derivado del mismo se enlaza inmunoespecíficamente con CD30.

50 En una forma de realización específica, la invención comprende un anticuerpo o derivado comprendiendo un dominio variable de cadena pesada, comprendiendo dicho dominio variable (a) un conjunto de tres CDRs, en el cual dicho conjunto de CDRs comprende las SEC ID NO:20, 22 o 24 y (b) un conjunto de cuatro regiones de armazón, en el cual dicho conjunto de regiones de armazón difiere del conjunto de regiones de armazón en el anticuerpo monoclonal HeFi-1, y en el cual dicho anticuerpo o derivado del mismo se enlaza inmunoespecíficamente con CD30.

55 En una forma de realización específica, la invención encierra un anticuerpo o derivado del mismo comprendiendo un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo dicho dominio variable (a) un conjunto de tres CDRs, en el cual dicho conjunto de CDRs comprende las SEC ID NO: 12, 14 o 16, y (b) un conjunto de cuatro regiones de armazón, en el cual dicho conjunto de regiones de armazón difiere del conjunto de regiones de armazón en el anticuerpo monoclonal AC 10, y en el cual dicho anticuerpo o derivado del mismo se enlaza inmunoespecíficamente con CD30.

60 En una forma de realización específica, la invención comprende un anticuerpo o derivado del mismo comprendiendo un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo dicho dominio variable (a) un conjunto de tres CDRs, en el cual dicho conjunto de CDRs comprende las SEC ID NO:28, 30, o 32, y (b) un conjunto de cuatro regiones de armazón, en el cual dicho conjunto de regiones de armazón difiere del conjunto de regiones de armazón en el anticuerpo monoclonal HeFi-1, y en el cual dicho anticuerpo o derivado del mismo se enlaza inmunoespecíficamente con CD30.

ES 2 339 333 T3

Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención también pueden estar descritos o especificados en cuanto a sus estructuras primarias. Los anticuerpos teniendo al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% y de la forma más preferible al menos un 98% de identidad (calculado usando métodos conocidos en la técnica y descritos aquí) con las regiones variables y AC10 o HeFi-1 también se incluyen en la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en cuanto a su afinidad de enlace con CD30. Las afinidades de enlace preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd menor que 5×10^{-2} m, 10^{-2} m, 5×10^{-3} m, 10^{-3} m, 5×10^{-4} m, 10^{-4} m, 5×10^{-5} m, 10^{-5} m, 5×10^{-6} m, 10^{-6} m, 5×10^{-7} m, 10^{-7} m, 5×10^{-8} m, 10^{-8} m, 5×10^{-9} m, 10^{-9} m, 5×10^{-10} m, 10^{-10} m, 5×10^{-11} m, 10^{-11} m, 5×10^{-12} m, 10^{-12} m, 5×10^{-13} m, 10^{-13} m, 5×10^{-14} m, 10^{-14} m, 5×10^{-15} m, ó 10^{-15} m.

Los anticuerpos de la invención incluyen derivados modificados, es decir, mediante la fijación covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de manera que la fijación covalente no previene al anticuerpo de enlazarse con CD30 o de ejercer un efecto citostático o citotóxico en células de HD. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, rotura proteolítica, conexión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se puede realizar cualquiera de las diferentes modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitándose a rotura química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no tradicionales.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos policlonales para CD30 pueden producirse por diferentes procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el CD30 puede administrarse a diferentes animales huésped incluyendo, pero no limitándose a, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros conteniendo anticuerpos policlonales específicos para la proteína. Pueden usarse diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huésped, e incluyendo pero no limitándose a, el de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tales como lisolecitina, polioles plurímeros, polianiones, péptidos, emulsiones de aceites, hemocianinas de la lapa cerradura, dinitrofenol, y adyuvantes humanos útiles de forma potencial tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *corinebacterium parvum*. Tales adyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de exposición en fago, o una combinación de las mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí no está limitado a los anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, y no el método por el cual se produce.

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitativo, los ratones pueden inmunizarse con CD30 o una expresión de la célula de CD30 o un fragmento o derivado del mismo. Una vez se ha detectado una respuesta inmunitaria, p. ej., se han detectado anticuerpos específicos para CD30 en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas para cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponibles a partir del ATCC.

Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. Los clones del hibridoma se evalúan después por métodos conocidos en la técnica para células que segregan anticuerpos capaces de enlazarse con CD30. El fluido ascítico, que contiene generalmente niveles altos de anticuerpos, puede generarse inyectando clones de hibridoma positivos a los ratones.

También se describen métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende el cultivo de una célula de hibridoma secretando un anticuerpo de la invención donde, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y después seleccionando los hibridomas que resultan de la fusión para los clones de hibridoma que segregan un anticuerpo capaz de enlazarse con CD30.

Fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos de Fab y $F(ab')_2$ de la invención pueden producirse por rotura proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaina (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de $F(ab')_2$). Los fragmentos de $F(ab')_2$ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH 1 de cadena pesada.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diferentes métodos de exposición en fago conocidos en la técnica. En métodos de exposición en fago, se muestran dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de ácidos nucleicos codificándolas. En una

forma de realización particular, tal fago puede utilizarse para mostrar dominios de unión de antígenos expresados a partir de un repertorio o librería de anticuerpos combinatoria (p. ej., humanos o de murina). En métodos de exposición en fago, se muestran dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L se amplifican a partir de bancos de ADNc animal (p. ej., tejidos oflimfoides de bancos de ADNc humano o de murina). El ADN que codifica los dominios V_H y V_L se recombina junto con un enlazador scFv por PCR y se clona en un vector fagémido (p. ej., p CANTAB 6 o pComb 3 HSS).

El vector se somete a electroporación en *E. coli* y el *E. coli* se infecta con fago auxiliar. El fago usado en estos métodos es típicamente fago filamentoso incluyendo fd y dominios de unión M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpos de Fab, FV o FV de disulfuro estabilizado recombinantemente fusionados bien a la proteína del gen III o gen VIII de fago. El fago expresando un dominio de unión de antígenos que enlaza con CD30 o una parte de unión de AC10 o HeFi del mismo puede seleccionarse o identificarse con antígeno p. ej., usando antígeno marcado o antígeno enlazado o capturado en una superficie sólida o reborde. Ejemplos de métodos de exposición en fago que pueden utilizarse para hacer los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, Gene 187:9-18; Burton *et al.*, 1994, Advances in Immunology, 191-280; número de solicitud de PCT. PCT/GB91/01 134; Publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401; y los números de patente estadounidense 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias de arriba, después de la selección de fago, las regiones codificantes de anticuerpos de fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos enteros, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento enlazante de antígenos deseado, y expresado en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura, y bacterias, p. ej., como se describe en detalle más abajo. Por ejemplo, las técnicas para producir de forma recombinante fragmentos de Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, BioTechniques 1992, 12(6):864-869; y Sawai *et al.*, 1995, AJRI 34:26-34; y Better *et al.*, 1988, Science 240: 1041-1043.

Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir FVs monocatenarios y anticuerpos incluyen los descritos en las patentes estadounidenses nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, 1991, Methods in Enzymology 203:46-88; Shu *et al.*, 1993, PNAS 90:7995-7999; y Skerra *et al.*, 1988, Science 240:1038-1040. Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de citotoxicidad o de proliferación *in vitro*, es preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual las diferentes partes del anticuerpo se derivan de distintas especies animales, tales como anticuerpos con una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de la murina y una región constante de la inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase p. ej., Morrison, Science, 1985, 229:1202; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; Gillies *et al.*, 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; patentes estadounidenses nos. 5.807.715, 4.816.567, y 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados son de moléculas de anticuerpos a partir de anticuerpos de especies no humanas que enlazan con el antígeno deseado teniendo uno o más CDRs a partir de las especies no humanas y las regiones constantes y de armazón a partir de una inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los residuos de armazón en las regiones de armazón humanas se sustituirán por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, el enlace de antígeno. Estas sustituciones del armazón se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., modelando las interacciones de los residuos de CDR y del armazón para identificar residuos de estructura importantes para el enlace de antígenos y la comparación de secuencia para identificar residuos del armazón inusuales en posiciones particulares. (Véase, p. ej., Queen *et al.*, patente estadounidense n°. 5.585.089; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323.

Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injertos de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 9 1/09967; patentes estadounidenses Nos. 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), revistiendo o renovando la capa superficial (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology, 1991, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska. *et al.*, 1994, PNAS 91:969-973), y redistribuyendo la cadena (patente estadounidense n°. 5.565.332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden crearse por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo los métodos de exposición en fago anteriormente descritos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de la inmunoglobulina humana. Véase también, las patentes U.S. Nos. 4.444.887 y 4.716.111, y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que expresen genes de la inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina humanos de cadena pesada y ligera pueden introducirse de forma aleatoria o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Los

genes de inmunoglobulina de ratón de cadena pesada y ligera pueden restituirse de forma no funcional separadamente o simultáneamente a la introducción de lugares geométricos de la inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se reproducen después para producir descendencia homocigota que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, p. ej., todos o una parte de CD30. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse a partir de los ratones inmunizados y transgénicos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de la célula B, y posteriormente experimentan conmutación de clase y mutación somática. Así, usando tal técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM y IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase, Lonberg and Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93. Para una discusión detallada sobre esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos humanos monoclonales y protocolos para producir anticuerpos de este tipo, véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 98/24893, WO 92/01047, WO 96/34096, WO 96/33735, la patente europea n.º. 0 598 877; las patentes estadounidenses Nos. 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, 5.885.793, 5.916.771. Además, compañías tales como Abgenix, inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San José, CA) pueden comprometerse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la anteriormente descrita.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica referida como "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo monoclonal no-humano seleccionado, p. ej., un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano reconociendo el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, 1994, *Bio/technology* 12:899-903).

Además, los anticuerpos para CD30 pueden, sucesivamente, utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imiten" a proteínas de la invención usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. (Véase, p. ej., Greenspan & Bona, 1989, *FASEB J.* 7(5):437-444; y Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438). Fragmentos de Fab de tales anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para suscitar una respuesta inmunitaria propia individual contra el CD30 y las células de HD.

La invención también comprende anticuerpos, que inhiben competitivamente la unión de AC10 o HeFi-1 con CD30 como se ha determinado por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos aquí. En formas de realización preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión de AC10 o HeFi-1 con CD30 al menos en un 50%, más preferiblemente al menos en un 60%, aún más preferiblemente al menos en un 70%, y de la forma más preferible al menos en un 75%. En otras formas de realización, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión de AC10 o HeFi-1 con CD30 en al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, o al menos un 95%.

Como se discute en más detalle abajo, el anticuerpo de la presente invención puede usarse o bien sólo o en combinación con otras composiciones en la prevención o tratamiento de la HD. Los anticuerpos pueden además conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones de manera covalente y no covalente) a agentes citotóxicos, proteínas u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse recombinantemente a moléculas útiles como quimioterapéuticos o toxinas, o comprender un radionucleido para el uso como un radioterapéutico. Véase, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/08495, WO 91/14438, WO 89/12624, la patente estadounidense n.º. 5.314.995, y EP 396.387.

Las proteínas pueden producirse recombinantemente fusionando la región codificante de uno o más de los CDRs de un anticuerpo de la invención en la estructura con una codificación de secuencia para una proteína heteróloga. La proteína heteróloga puede proporcionar una o más de las siguientes características: beneficios añadidos terapéuticos; promueven la expresión estable de la proteína proporcionan unos medios para facilitar la expresión recombinante de rendimiento elevado de la proteína; o proporcionan un dominio de multimerización.

Además de las proteínas que comprenden uno o más CDRs de un anticuerpo de la invención, las proteínas pueden identificarse usando cualquier método adecuado de selección para interacciones proteína-proteína. Inicialmente, las proteínas se identifican por enlazarse con CD30, entonces se puede determinar su capacidad para ejercer un efecto citostático o citotóxico en células de HD. Entre los métodos tradicionales que se pueden emplear están las técnicas de "clonación por interacción" las cuales implican evaluar las bibliotecas de expresión con CD30 marcado de modo similar a la técnica de la evaluación del anticuerpo de las bibliotecas de λ gt11, *supra*. A modo de ejemplo y no de limitación, esto puede conseguirse de la siguiente manera: un clon de ADNc que codifica CD30 (o un dominio de unión de AC10 o HeFi-1 del mismo) se modifica en el extremo insertando el sitio de fosforilación para la quinasa del músculo del corazón (HMK) (Blonar & Rutter, 1992 *Science* 256:1014-1018). La proteína recombinante se expresa en *E. coli* y se purifica en una columna de afinidad con GDP hasta su homogeneidad (Edery *et al.*, 1988, *Gene* 74:517-525) y se marca usando γ -³²P-ATP y (Sigma) quinasa de músculo de corazón bovino a una actividad específica de 1×10^6 cpm/ μ g, y se usa para seleccionar genoteca de ADNc de λ gt11 de una placenta humana en un "ensayo Far Western" (Blonar & Rutten, 1992 *Science* 256:1014-1018). Las placas que interactúan con la sonda CD30 se aíslan. Los insertos de ADNc de placas de λ gt11 positivo se liberan y se subclonan en un vector adecuado para la secuenciación, tal como Ks PBluescript (Stratagene).

ES 2 339 333 T3

Un método que detecta interacciones de proteínas *in vivo*, el sistema de dos híbridos, se describe en detalle con objetivos ilustrativos solamente y no a modo de limitación. Se ha descrito una versión de este sistema (Chien *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 88:9578-9582) y está comercialmente disponible a través de Clontech (Palo Alto, CA).

Brevemente, utilizando tal sistema, los plásmidos se construyen de manera que codifican dos proteínas híbridas: uno consiste en el dominio de enlace de ADN de una proteína activadora de transcripción fusionada con CD30, y el otro consiste en el dominio de activación de la proteína activadora fusionado con una proteína desconocida que está codificada por un ADNc que se ha recombinado en este plásmido como parte de una genoteca de ADNc. Los plásmidos se transforman en una cadena de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que contiene un gen indicador (p. ej., lacZ) cuya región reguladora contiene los sitios de unión del activador de la transcripción. Cualquier proteína híbrida por sí misma no puede activar la transcripción del gen indicador, el híbrido del dominio de enlace de ADN no puede porque no proporciona la función de activación, y el híbrido del dominio de activación no puede porque no puede localizar los sitios de unión activadores. La interacción de las dos proteínas híbridas reconstruye la proteína funcional activadora y resulta en la expresión del gen indicador, que se detecta por un ensayo sobre el producto del gen indicador.

El sistema de dos híbridos o la metodología relacionada puede utilizarse para seleccionar bibliotecas de dominios de activación para proteínas que interactúan con CD30, que en este contexto es un producto genético "trampa". Las secuencias totalmente genómicas o de ADNc se fusionan con el ADN codificando un dominio de activación. Esta librería y un plásmido codificando un híbrido de una región de codificación CD30 (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de CD30 conocido por interactuar con HeFi-1 o AC10) fusionado con el dominio de unión de ADN se cotransforman en una cadena indicadora de la levadura, y de los transformantes resultantes se seleccionan los que expresan el gen indicador. Por ejemplo, y no a modo de limitación, la región de codificación de CD30 puede clonarse en un vector de manera que se fusiona traduccionalmente con el ADN que codifica el dominio de enlace de ADN de la proteína Gal4. Estas colonias se purifican y los plásmidos de la librería responsables de la expresión del gen indicador se aíslan. La secuenciación de ADN se usa después para identificar las proteínas codificadas por los plásmidos de la librería.

Una vez se identifica una proteína de enlace de CD30, su capacidad (sola o al multimerizarse o fusionarse con un dominio de dimerización o multimerización) para producir un efecto citostático o citotóxico en células HD se determina poniendo en contacto un cultivo de una línea celular de HD, tal como L428, L450, HDLM2 o KM-H2, con la proteína. Las condiciones de cultivo son de la forma más preferible de aproximadamente 5.000 células en una área de cultivo de aproximadamente 0,33 cm², y siendo el periodo de contacto de aproximadamente 72 horas. El cultivo se expone después a 0.5 μ Ci de ³H-timidina durante las 8 horas finales del periodo de 72 horas y se mide la incorporación de ³H-timidina en las células de cultivo. La proteína tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de HD si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular cultivada bajo las mismas condiciones pero no estando en contacto con la proteína.

Sin limitación en cuanto al mecanismo de acción, una proteína tiene preferiblemente más de un sitio de unión de CD30 y en consecuencia una capacidad para reticular moléculas de CD30. Las proteínas que se enlazan con CD30 o compiten por enlazarse a CD30 con AC10 o HeFi-1 pueden adquirir la capacidad de inducir efectos citostáticos o citotóxicos en células de HD al dimerizarse o multimerizarse. Donde la proteína de unión de CD30 es una proteína monomérica, puede expresarse en serie, dando de ese modo como resultado una proteína con múltiples sitios de unión de CD30. Los sitios de unión de CD30 pueden separarse por una región del enlazador flexible. En otra forma de realización, las proteínas de unión de CD30 pueden reticularse químicamente, por ejemplo usando glutaraldehído, antes de la administración. En una forma de realización preferida, la región de unión de CD30 se fusiona con una proteína heteróloga, donde la proteína heteróloga comprende un dominio de dimerización y multimerización. Antes de la administración de la proteína a un sujeto con motivo de tratar o prevenir la HD, tal proteína está sujeta a condiciones que permiten la formación de un homodímero o heterodímero. Un heterodímero, como se utiliza en este caso, puede comprender dominios de dimerización idénticos pero regiones de unión de CD30 diferentes, idénticos dominios de unión de CD30 pero diferentes regiones de dimerización, o diferentes regiones de unión de CD30 y dominios de dimerización.

Son dominios de dimerización particularmente preferidos los que se originan a partir de factores de transcripción.

En una forma de realización, el dominio de dimerización es el de un cierre de leucina de la región básico ("bZIP"). Las proteínas de bZIP poseen de forma característica dos dominios: un dominio estructural de cierre de leucina y un dominio básico rico en aminoácidos básicos, separado por un dominio "de horquilla" (C. Vinson *et al.*, 1989, Science, 246:911-916). Dos proteínas de bZIP se dimerizan formando una región de la bobina enrollada en la cual se dimerizan los dominios del cierre de leucina. Por consiguiente, estas regiones de la bobina enrollada pueden usarse como compañeras de fusión para las proteínas.

Son dominios de cierre de leucina particularmente útiles aquellos del factor de transcripción de la levadura GCN4, el factor de transcripción mamífera CCAAT/estimulador-proteína C de unión/EBP, y la transformación nuclear en productos de oncogenes, Fos y Jun (véase Landschultz *et al.*, 1988, Science 240:1759-1764; Baxevanis y Vinson, 1993, Curr. Op. Gen. Devel., 3:278-285; y O'Shea *et al.*, 1989, Science, 243:538-542).

En otra forma de realización, el dominio de dimerización es el de una proteína de hélice-bucle-hélice de una región básica (“bHLH”) (Murre *et al.*, 1989, Cell, 56:777-783). Las proteínas bHLH también están compuestas por dominios específicos, la estructura de las cuales permite reconocer e interactuar con secuencias específicas de ADN. La región de hélice-bucle-hélice promueve la dimerización a través de sus hélices anfipáticas de un modo análogo al de la región de cierre de leucina de las proteínas bZIP (Davis *et al.*, 1990 Cell, 60:733-746; Voronova y Baltimore, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4722-4726). Son proteínas hHLH particularmente útiles mic, max, y mac.

Los heterodímeros se conocen por formarse entre Fos y Jun (Bohmann *et al.*, 1987, Science, 238:1386-1392), entre miembros de la familia de ATF/CREB (Hai *et al.*, 1989, Genes Dev., 3:2083-2090), entre miembros de la familia de C/EBP (Cao *et al.*, 1991, Genes Dev., 5:1538-1552; Williams *et al.*, 1991, Genes Dev., 5:1553-1567; y Román *et al.*, 1990, Genes Dev., 4:1404-1415), y entre miembros de las familias de ATF/CREB y de Fos/Jun Hai y Curran, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3720-3724). En consecuencia, cuando se administra una proteína a un sujeto como un heterodímero comprendiendo dominios de dimerización diferentes, se puede usar cualquier combinación de las anteriores.

5.2 Ensayos de unión

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la invención se enlazan con CD30 y ejercen un efecto citostático o citotóxico en células de HD. Métodos para demostrar la capacidad de un anticuerpo de la invención para enlazarse con CD30 se describen aquí.

En los anticuerpos de la invención se puede analizar su unión inmunoespecífica con CD30 por cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos que pueden usarse incluyen pero no se limitan a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como Western blots, radioinmunoanálisis, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), ensayos de “sandwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, ensayos fluorescentes, ensayos de proteína A, sólo por nombrar unos pocos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York,). Inmunoensayos ejemplares se describen brevemente abajo (pero no se utilizan a modo de limitación).

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden el lisado de una población de células en un tampón de lisis tal como el tampón RIPA (1% de NP-40 o Tritón X-100, 1% de deoxicolato de sodio, 0.1% de SDS, 0.15 M de NaCl, 0.01 M de fosfato sódico a pH 7.2, 1% de Trasilol) suplementado con fosfatasa de proteína y/o inhibidores de proteasa (p. ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadiendo el anticuerpo al lisado de la célula, incubando durante un periodo temporal (p. ej., de 1-4 horas) a 40°C, añadiendo microesferas de sefarosa de proteína A y/o proteína G al lisado de la célula, incubando durante aproximadamente una hora o más a 40°C, lavando las microesferas en el tampón de lisis y resuspendiendo las microesferas en SDS/muestra del tampón. La capacidad del anticuerpo para inmunoprecipitar CD30 puede analizarse mediante, p. ej., el análisis Western blot. Un experto en la técnica entendería en cuanto a los parámetros que estos pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo con CD30 y reducir el fondo (p. ej., precompensando el lisado de la célula con microesferas de sefarosa). Para más información sobre protocolos de inmunoprecipitación véase, p. ej., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

El análisis Western blot generalmente comprende preparar muestras de proteína, la electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (p. ej., un 8%-20% de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nilón, incubar la membrana en solución de bloqueo (p. ej., PBS con un 3% de BSA o leche no grasa), lavar la membrana en tampón de lavado (p. ej., PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (es decir, el anticuerpo anti-CD30 putativo) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, incubar la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, p. ej., un anticuerpo anti-humano) conjugada para un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (p. ej., ³²P ó ¹²⁵I) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del anticuerpo secundario. Un experto en la técnica entendería en cuanto a los parámetros que estos pueden modificarse para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para mayor discusión sobre protocolos de Western blot véase, p. ej., Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York a 10.8.1.

Los ELISA comprenden preparar el antígeno (es decir, CD30), revestir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el CD30, añadir el anticuerpo conjugado a un compuesto detectable tal como uno enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del anticuerpo. En los ELISA el anticuerpo no tiene que conjugarse a un compuesto detectable; en cambio, un segundo anticuerpo (el cual reconoce el anticuerpo de interés) conjugado a un compuesto detectable puede añadirse al pocillo. Además, en vez de revestir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede revestirse por el pocillo. En este caso, un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable puede añadirse tras la adición de proteína CD30 al pocillo revestido. Un experto en la técnica entendería que los parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada al igual que otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para mayor discusión relacionada con los ELISA véase, p. ej., Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York a 11.2.1.

ES 2 339 333 T3

La afinidad de enlace de un anticuerpo con CD30 y la velocidad de interacción de un anticuerpo CD30 puede determinarse por ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de enlace competitivo es un radioinmunoanálisis que comprende la incubación de CD30 marcado (p. ej., ^3H ó ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades en aumento de CD30 no marcado, y la detección del enlace del anticuerpo con el CD30 marcado. La afinidad del anticuerpo por CD30 y las velocidades de unión pueden determinarse a partir de los datos mediante un análisis Scatchard plot. La competición con un segundo anticuerpo (tal como AC10 o HeFi-1) también puede determinarse usando radioinmunoanálisis. En este caso, el CD30 se incuba con el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto marcado (p. ej., ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades en aumento de un segundo anticuerpo no marcado.

En los anticuerpos de la invención también puede analizarse su capacidad para enlazarse con CD30 mediante un ensayo estándar conocido en la técnica. Tales ensayos incluyen far Westerns y el sistema de dos híbridos de levadura. Estos ensayos se describen en la sección 5.2, arriba. Otra variación en la técnica de far Western anteriormente descrita implica la medición de la capacidad de un anticuerpo candidato marcado para enlazarse con CD30 en una Western blot. En un ejemplo no limitativo de una Western blot, el CD30 o el fragmento de interés del mismo se expresa como una proteína de fusión comprendiendo además glutatona-S-transferasa (GST) y un sitio de reconocimiento de la serina/treonina quinasa de proteína (tal como un sitio de reconocimiento de la quinasa dependiente de AMPc). La proteína de fusión se purifica en microesferas de Sefarosa de glutatona (Pharmacia Biotech) y se marca con quinasa de corazón bovino (Sigma) y $100\ \mu\text{Ci}$ de ^{32}P -ATP (Amersham). Los anticuerpos de prueba de interés se separan mediante SDS-PAGE y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, después se incuban con el CD30 marcado. Luego, la membrana se lava y la radioactividad se cuantifica. A la inversa, el anticuerpo de interés puede marcarse por el mismo método y se usa para probar una membrana de nitrocelulosa sobre la que se ha transferido el CD30.

5.3 Pruebas de actividades citotóxicas y citostáticas

Por definición, un anticuerpo de la invención debe ejercer un efecto citostático o citotóxico en una célula de HD. Líneas celulares HD adecuadas para este propósito incluyen L428, L450, HDLM2 y KM-H2 (la totalidad de los cuales está disponible a través de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DMSZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)).

Muchos métodos para determinar si un anticuerpo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una célula se conocen por los expertos en la técnica, y pueden utilizarse para averiguar si una proteína en particular es una proteína de la invención. Ejemplos ilustrativos de métodos de este tipo se describen abajo.

Un vez se ha identificado un anticuerpo de manera que ambos (i) se enlazan con CD30 y (ii) ejercen un efecto citostático o citotóxico en células de HD, su valor terapéutico se valida en un modelo animal, como se describe en la Sección 6, abajo.

En una forma de realización preferida, se puede determinar si un anticuerpo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de HD poniendo en contacto un cultivo de 5.000 células de la línea celular de HD en un área del cultivo de aproximadamente $0,33\ \text{cm}^2$ con el anticuerpo durante un periodo de 72 horas. Durante las últimas 8 horas del periodo de 72 horas, el cultivo se expone a $0,5\ \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina. La incorporación de ^3H -timidina en células del cultivo se mide después. El anticuerpo tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de HD y es útil para el tratamiento o prevención de la HD si las células del cultivo que estuvieron en contacto con el anticuerpo han reducido la incorporación de ^3H -timidina en comparación con las células de la misma línea celular de HD cultivada bajo las mismas condiciones pero no habiendo estado en contacto con el anticuerpo anti-CD30.

Hay muchos ensayos de citotoxicidad conocidos por los expertos en la técnica. Algunos de estos ensayos miden la necrosis, mientras que otros miden la apoptosis (muerte programada de la célula). La necrosis va acompañada de una permeabilidad aumentada de la membrana plasmática; las células se hinchan y la membrana plasmática se rompe en unos minutos. En cambio, la apoptosis se caracteriza por el blebbing de la membrana, la condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. Sólo uno de estos efectos en células de HD es suficiente para mostrar que un anticuerpo de enlace de CD30 es útil en el tratamiento o prevención de la HD como una alternativa a los ensayos de medición de efectos citostáticos o citotóxicos anteriormente descritos.

En una forma de realización, la necrosis medida por la capacidad o incapacidad de una célula para aceptar un colorante tal como rojo neutral, azul de tripán, o ALAMAR (Page *et al.*, 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). En tal ensayo, las células se incuban en medios conteniendo el colorante, las células se lavan, y el colorante restante, reflejando la aceptación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente.

En otra forma de realización, el colorante es sulforhodamina B (SRB), cuya unión con anticuerpos puede usarse como una medida de citotoxicidad (Skehan *et al.*, 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12).

En otra forma de realización más, una sal de tetrazolio, tal como MTT, se usa en un ensayo colorimétrico cuantitativo de supervivencia y proliferación de la célula mamífera detectando células vivas, pero no muertas (véase, p. ej., Mosmann, 1983, J. Immunol. Métodos 65:55-63).

En otra forma de realización más, las células apoptóticas se miden en el compartimento unido y en el "flotante" del cultivo. Ambos compartimentos se recogen eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, y combinando

ambas preparaciones después de una fase de lavado de centrifugado (10 minutos, 2000 r.p.m.). El protocolo para tratar cultivos de células tumorales con sulindac y compuestos relacionados para obtener una cantidad significativa de apoptosis se ha descrito en la bibliografía (véase, p. ej., Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16). Las características de este método incluyen recoger las células flotantes y unidas, la identificación de los tiempos de tratamiento y rango de dosis óptimos para observar la apoptosis, y la identificación de condiciones óptimas de cultivo celular.

En otra forma de realización más, la apoptosis se cuantifica midiendo la fragmentación de ADN. Hay disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación de ADN. Ejemplos de ensayos de este tipo, incluyendo TUNEL (que detecta incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en *Biochemica*, 1999, n.º. 2, págs. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

En otra forma de realización más, la apoptosis se puede observar morfológicamente. Tras el tratamiento con un anticuerpo de prueba, se pueden analizar cultivos para apoptosis y necrosis por microscopía fluorescente después del marcado con naranja de acridina y bromuro de etidio. El método para medir el número de células apoptóticas se ha descrito previamente por Duke & Cohen, 1992, *Current Protocols In Immunology*, Coligan *et al.*, eds., 3.17.1-3.17.16. En otro modo de la forma de realización, las células pueden marcarse con el yoduro de propidio del colorante del ADN, y las células en las que se han observado cambios morfológicos tales como condensación de cromatina y marginación a lo largo de la membrana nuclear interna, condensación citoplásmica, blebbing de membrana aumentado y contracción celular.

En otra forma de realización más, los efectos citotóxicos y/o citostáticos pueden determinarse midiendo el nivel de incorporación de bromodeoxiuridina. Las células se cultivan en medios completos con un anticuerpo de prueba. En momentos diferentes, las células se marcan con bromodeoxiuridina para detectar la síntesis de ADN naciente, y con yodina de propidio para detectar el contenido de ADN total. Las células marcadas se analizan para averiguar la posición del ciclo celular por citometría de flujo usando el programa informático Cellfit de Becton-Dickinson tal y como se describe anteriormente (Donaldson *et al.*, 1997, *J. Immunol. Meth.* 203:25-33). Un ejemplo de uso de la incorporación de bromodeoxiuridina para determinar los efectos citostáticos y/o citotóxicos de los anticuerpos anti-CD30 de la invención se describe en la Sección 9, abajo.

5.4 Ácidos nucleicos

También se describen ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de nucleótidos codificando una proteína, y fragmentos de la misma. Los ácidos nucleicos preferiblemente codifican uno o más CDRs de anticuerpos que enlazan con CD30 y ejercen efectos citotóxicos o citostáticos en células de HD. Ácidos nucleicos ejemplares comprenden la SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SÉC ID NO:7, SEC ID n.º: 11, SEC ID NO:13, SEC ID NO:15, SEC ID NO:19, SEC ID NO:21, SEC ID NO:23, SEC ID NO:27, SEC ID NO:29 o SEC ID NO:31. Los ácidos nucleicos preferidos comprenden la SEC ID NO:1, SEC ID NO:9, SEC ID NO: 17, ó SEC ID NO:25. (véase la Tabla 1 en las páginas 9-10, arriba, para la identificación del dominio de AC10 o HeFi-1 a los cuales estos identificadores de secuencia corresponden).

También se describen ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones de hibridación rigurosas, moderadas o de baja astringencia, para los ácidos nucleicos, preferiblemente, ácidos nucleicos codificando un anticuerpo de la invención.

A modo de ejemplo y no de limitación, a continuación hay procedimientos que usan tales condiciones de baja astringencia para regiones de hibridación de alrededor de 90 nucleótidos (véase también Shilo and Weinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78,: 6789-6792). Los filtros conteniendo ADN se pretratan durante 6 horas a 40°C en una solución conteniendo un 35% de formamida, 5X de SSC, 50 mM de tris-HCl (a pH 7.5), 5 mM de EDTA, 0.1% de PVP, 0.1% de Ficoll, 1% de BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se realizan en la misma solución con las modificaciones siguientes: un 0,02% de PVP, un 0,02% de Ficoll, 0,2% de BSA, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, un 10% (p/vol) de sulfato de dextrano, y se usa una sonda marcada con ³²P de 5-20 X 10⁶ cpm. Los filtros se incuban en una mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C, y después se lavan durante 1,5 H a 55°C en una solución que contiene 2X de SSC, 25 mM de tris-HCl (a pH 7.4), 5 mM de EDTA, y un 0,1% de SDS. La solución de lavado se sustituye por una solución fresca y se incuban durante 1,5 h adicional a 60°C. Los filtros se transfieren secos y se exponen a autoradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se reexponen a una película. Otras condiciones de astringencia baja que pueden usarse se conocen bien en la técnica (p. ej., como se emplea para las hibridaciones de cruces de especies).

Además, a modo de ejemplo y no de limitación, los procedimientos que usan tales condiciones de alta astringencia para regiones de hibridación de más de 90 nucleótidos son de la siguiente manera. La prehibridación de filtros conteniendo ADN se realiza durante 8 h o durante toda la noche a 65°C en un tampón compuesto por 6X de SSC, 50 mM de tris-HCl (a pH 7.5), 1 mM de EDTA, 0.02% de PVP, 0.02% de Ficoll, 0.02% de BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se hibridizan durante 48 H a 65 ÅñC en una mezcla de prehibridación conteniendo 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y una sonda marcada con ³²P de 5-20 X 10⁶ cpm. El lavado de filtros se realiza a 37°C durante 1 h en una solución conteniendo 2X de SSC, un 0,01% de PVP, un

ES 2 339 333 T3

0,01% de Ficoll, y un 0,01% de BSA. Esto va seguido por un lavado en 0,1X de SSC a 50°C durante 45 min antes de la autoradiografía.

Otras condiciones de alta astringencia que pueden usarse dependen de la naturaleza del ácido nucleico (p. ej. longitud, contenido de GC, etc.) y el propósito de la hibridación (detección, amplificación, etc.) y se conocen en la técnica. Por ejemplo, la hibridación rigurosa de un ácido nucleico de aproximadamente 15-40 bases a una secuencia complementaria en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realiza bajo las condiciones siguientes: una concentración de sal de 50 mM de KCl, una concentración de tampón de 10 mM de tris-HCl, una concentración de Mg^{2+} de 1,5 mM, un pH de 7-7.5 y una temperatura de reconocimiento de 55-60°C.

En otra forma de realización específica, se provee un ácido nucleico hibridizable a un ácido nucleico, o su complemento, bajo condiciones de astringencia moderada. La selección de condiciones apropiadas para este tipo de astringencias se conoce bien en la técnica (véase p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; véase también, Ausubel *et al.*, eds., in *the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals*, © 1987-1997, Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.).

Pueden obtenerse los ácidos nucleicos, y puede determinarse la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos determinados, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos de la proteína se conoce, un ácido nucleico codificando el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados (p. ej., como se describe en Kutmeier *et al.*, 1994, *BioTechniques* 17:242), lo que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos de superposición conteniendo partes de la secuencia codificando la proteína, el recocido y el ligado de estos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

De forma alternativa, un ácido nucleico codificando una proteína puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon conteniendo un ácido nucleico codificando una proteína particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula de la proteína se conoce, un ácido nucleico codificando la proteína puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada (p. ej., una genoteca de ADNc tal como una genoteca de ADNc de un anticuerpo o una genoteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente poli A+ ARN, aislado a partir de, cualquier tejido o célula expresando la proteína. Si la proteína es un anticuerpo, la fuente de la librería puede ser células del hibridoma seleccionadas para expresar el anticuerpo de la invención) por amplificación de PCR usando cebadores sintéticos hibridizables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o clonando usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia de genes particular a identificar, p. ej., un clon de ADNc a partir de una genoteca de ADNc que codifica la proteína. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse entonces en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez se han determinado la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondientes de los anticuerpos, la secuencia de nucleótidos de la proteína puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, p. ej., técnicas de ADN recombinantes, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel *et al.*, eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos con una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones de aminoácido, deleciones, y/o inserciones.

En una forma de realización específica, la proteína es un anticuerpo, y la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera pueden inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDRs por métodos que se conocen bien en la técnica, p. ej., por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinantes rutinarias, una o más de las CDRs pueden insertarse dentro de regiones tipo, p. ej., en regiones tipo humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe arriba. Las regiones tipo pueden tener origen natural o ser regiones tipo consensuadas, y preferiblemente son regiones tipo humanas (véase, p. ej., Chothia *et al.*, 1998, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 para catalogar regiones de estructura humana). El ácido nucleico generado por la combinación de las regiones tipo y CDRs codifica un anticuerpo que se enlaza específicamente con CD30 y ejerce un efecto citostático y/o citotóxico en células de HD. Preferiblemente, como se ha tratado anteriormente, pueden realizarse una o más sustituciones del aminoácido dentro de las regiones tipo, y, preferiblemente, las sustituciones del aminoácido mejoran la unión del anticuerpo con CD30 y/o para realzar el efecto citostático y/o citotóxico del anticuerpo. Adicionalmente, pueden usarse métodos de este tipo para hacer sustituciones de aminoácidos o deleciones de uno o más residuos de cisteína de región variable participando en un enlace de disulfuro dentro de la cadena para generar moléculas de anticuerpos carentes de uno o más enlaces de disulfuro dentro de la cadena. Otras alteraciones al ácido nucleico están comprendidas en la habilidad de la técnica.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature* 314:452-454) uniendo genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad de antígeno apropiada junto con genes a partir de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se describe anteriormente, un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual partes diferentes se derivan de distintas especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un mAb de murina y una región constante de inmunoglobulina humana, p. ej., anticuerpos humanizados.

ES 2 339 333 T3

De forma alternativa, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente U.S. n°. 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544-54) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman conectando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región FV a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado una proteína monocatenaria. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos funcionales de FV en *E. Coli* (Skerra *et al.*, 1988, Science 242: 1038-1041).

5.5 Secuencias relacionadas con AC10 y HeFi-1

La presente invención comprende además anticuerpos comprendiendo una región de homología con las CDRs de AC10 y HeFi-1, o las regiones codificantes de los mismos, respectivamente. En diferentes formas de realización, la región de homología se caracteriza por al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad con la región correspondiente de AC10 o HeFi-1.

En una forma de realización, la presente invención comprende un anticuerpo con una región de homología con una CDR de HeFi-1 (SEC ID NO:20, SEC ID NO:22, SEC ID NO:24, SEC ID NO:28, SEC ID NO:30 o SEC ID NO:32). En otra forma de realización, la presente invención comprende un anticuerpo con una región de homología con un CDR de AC10 (SEC ID n°: 4, SEC ID NO:6, SEC ID NO:8, SEC ID NO:12, SEC ID NO:14, o SEC ID NO:16).

La presente invención comprende además anticuerpos que comprenden una región de homología con las regiones variables de AC10 y HeFi-1, o la región de codificación de los mismos, respectivamente. En diferentes formas de realización, la región de homología se caracteriza por al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad con la región correspondiente de AC10 o HeFi-1.

En una forma de realización, la presente invención comprende un anticuerpo con una región de homología con una región variable de HeFi-1 (SEC ID NO: 18 o SEC ID n°: 26). En otra forma de realización, la presente invención comprende un anticuerpo con una región de homología con una región variable de AC10 (SEC ID n°: 2 ó SEC ID n°: 10).

Para determinar la identidad del porcentaje de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, p. ej. entre las secuencias de una región variable de AC10 o HeFi-1 y secuencias de otros anticuerpos con regiones de homología con la región variable de AC10 o HeFi-1, las secuencias se alinean con propósitos de comparación óptimos (p. ej., se pueden introducir espacios en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos para la alineación óptima con una segunda secuencia de amino o de ácido nucleico). Después se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia se ocupa por el mismo residuo aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esta posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = # de idénticas posiciones/total # de posiciones (p. ej., posiciones de superposición) x 100). En una forma de realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La determinación de identidad porcentual entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido y no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico codificando una proteína modificadora SCA-1. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína modificadora SCA-1. Para obtener alineaciones distanciadas con fines de comparación, se puede utilizar BLAST distanciado como se describe en Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. De forma alternativa, se puede utilizar PSI-BLAST para realizar una búsqueda repetida que detecte relaciones de distancia entre moléculas (Id.). Al utilizar los programas BLAST, BLAST distanciado, y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido y no limitador de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Tal algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG. Utilizando el programa ALIGN para secuencias de aminoácidos de comparación, se pueden usar una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12, y una penalización de espacio de 4. Se conocen en la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias e incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. BioSci., 10: 3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que configura la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se obtienen regiones similares en las dos secuencias que se comparan mirando en parejas de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados únicos, ktup puede configurarse en 2 ó 1 para secuencias protéicas, o entre 1 y 6 para secuencias de ADN. Por defecto si ktup no está especificado es 2 para proteínas y 6 para ADN. Para una descripción de parámetros de FASTA más detallada, véase <http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/man/fasta.1.html#sect2>.

ES 2 339 333 T3

De forma alternativa, la alineación de la secuencia proteica puede realizarse usando el Algoritmo CLUSTAL W, como se describe por Higgins *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

5 La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las anteriormente descritas, permitiendo o sin permitir espacios. Al calcular la identidad porcentual, sólo se cuentan las coincidencias exactas.

5.6 Métodos para producir los anticuerpos de la invención

10 Los anticuerpos, de la invención se pueden producir por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de proteínas, en particular, por síntesis química o preferiblemente, por técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, incluyendo un fragmento, derivado o análogo del mismo, (p. ej., una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención) requiere la construcción de un vector de expresión conteniendo un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. Una vez se ha obtenido un ácido nucleico codificando un anticuerpo de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Así, métodos para preparar un anticuerpo expresando un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos codificando dicho anticuerpo se describen aquí. Métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para construir vectores de expresión conteniendo secuencias codificantes y señales de control transcripcionales y traducionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Se describen vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos codificando un anticuerpo de la invención operativamente enlazado a un promotor. La secuencia de nucleótidos puede codificar una cadena pesada o ligera relacionada, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, operativamente enlazado a un promotor. Vectores de este tipo pueden incluir la secuencia de nucleótidos codificando la región constante de la molécula de anticuerpos (véase, p. ej., la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente U.S. nº. 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en tal vector para la expresión de la cadena entera pesada o ligera.

30 El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células modificadas se cultivan después por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. También se describen células huésped que contienen un ácido nucleico codificando un anticuerpo de la invención, operativamente enlazado a un promotor heterólogo. En formas de realización preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores codificando tanto la cadena ligera como la pesada pueden coexpresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla abajo.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión huésped para expresar los anticuerpos de la invención. Tales sistemas de expresión huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, al transformarse o modificarse con las secuencias codificantes nucleótidas apropiadas, expresar un anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido conteniendo secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes conteniendo secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (p. ej., baculovirus) conteniendo secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión recombinantes de virus (p. ej., virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes (p. ej., plásmido Ti) conteniendo secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células mamíferas (p. ej., las células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) conteniendo constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células mamíferas (p. ej., promotor de la metalotioneína) o de virus mamíferos (p. ej., el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). Preferiblemente, células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpos enteras recombinantes, se usan para la expresión de una proteína recombinante de la invención. Por ejemplo, células mamíferas tales como células ováricas de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor más importante del gen temprano intermedio a partir del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para proteínas de la invención (Foeking *et al.*, 1986, *Gene* 45:101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8:2).

60 En sistemas bacterianos, varios vectores de expresión pueden seleccionarse ventajosamente dependiendo del uso previsto para los requisitos de modificación del pliegue y la post-traduccion del anticuerpo que se está expresando. Donde sea posible, cuando una gran cantidad de tal anticuerpo se va a producir, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Vectores de este tipo incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther *et al.*, 1983, *EMBO J.* 2:1791), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en la estructura con la región codificante lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de

fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión con microesferas de glutatona-agarosa matricial seguida de la elución en presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o sitios de rotura de trombina o de proteasa factor Xa de manera que el producto genético objetivo clonado puede liberarse a partir de la fracción GST.

5 En un sistema de insecto, se usa el virus de polihedrosis nuclear Autógrafa californica (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de la polihedrina).

10 En células huésped mamíferas, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En casos donde un adenovirus se usa como un vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de la invención puede ligarse a una unidad de control de la transcripción/traducción del adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia guía tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región esencial del genoma vírico (p. ej., la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante viable y capaz de expresar la proteína de la invención en huéspedes infectados, (véase, p. ej., Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 81: 355-359). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes insertadas. Estas señales incluyen el codón iniciador ATG y secuencias contiguas. Además, el codón iniciador debe estar sincronizado con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de la inserción entera. Estas señales de control traduccionales exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, ambos naturales y sintéticos. La eficiencia de la expresión puede mejorarse por la inclusión de elementos intensificadores de la transcripción apropiados, terminadores de transcripción, etc. (véase Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

25 Además, puede seleccionarse una cadena de la célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto genético de la forma específica deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y tratamientos (p. ej., ruptura) de productos de proteína pueden ser importantes para la función del anticuerpo de la invención. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el tratamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir líneas celulares apropiadas o sistemas huésped para asegurar la modificación y el tratamiento correctos de la proteína foránea expresada. Con este fin, pueden usarse células huésped eucarióticas que posean la maquinaria celular para el tratamiento apropiado de la transcripción primaria, glicosilación, y fosforilación del producto genético. Tales células huésped mamíferas incluyen pero no se limitan a CHO, VERO, BHK, Hela, Cos, MDCK, 293, 3T3, y W138.

35 Para la producción a largo plazo y con alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo de la invención pueden crearse genéticamente. Mejor que usando vectores de expresión que contengan orígenes víricos de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (p. ej., promotor, intensificador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, las células creadas genéticamente pueden dejarse crecer durante 40 1-2 días en unos medios enriquecidos, y después se trasladan a unos medios selectivos. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para crear genéticamente líneas celulares que expresen el anticuerpo de la 45 invención.

Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo pero no limitándose a los genes timidinquinasa del virus herpes simplex (Wiglen *et al.*, 1977, Cell 11:223), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 48:202), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22:8-17), pueden emplearse en las células tk-, hgrprt- o aprt-, respectivamente. También, la resistencia a los antimetabolitos puede usarse como la base de selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G 418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotechnology 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan and Anderson, 1993, Ana. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30:147). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y se describen métodos de este tipo, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1, que se incorpora por referencia aquí en sus totalidades.

65 Los niveles de expresión de un anticuerpo de la invención puede aumentarse por amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNY Cloning", Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema del vector que expresa el anticuerpo de la expresión es amplificable, el aumento en el nivel

del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada se une con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo de la invención también aumentará (Crouse *et al.*, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

5 La célula huésped puede comodificarse con dos vectores de expresión, el primer vector codificando una proteína derivada de cadena pesada y el segundo vector codificando una proteína derivada de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten igual expresión de proteínas de cadena pesada y ligera. De forma alternativa, puede usarse un único vector que codifique, y sea capaz de expresar, ambas proteínas de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería estar colocada delante de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada tóxica libre (Proudfoot, 1986, Nature 322:52 (1986); Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2 197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

15 Un vez se ha producido un anticuerpo de la invención por un animal, se ha sintetizado químicamente, o expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica de purificación de proteínas, por ejemplo, por cromatografía (p. ej., intercambio iónico; afinidad, particularmente por afinidad con el antígeno específico, Proteína A (para moléculas de anticuerpos, o afinidad con un compañero de fusión heteróloga donde el anticuerpo es una proteína de fusión; y calcular la cromatografía de columna), centrifugado, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

20 También se describen proteínas de unión con CD3 recombinantemente fundidas o químicamente conjugadas (incluyendo la conjugación covalente y la no covalente) a proteínas heterólogas (preferiblemente de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 aminoácidos) de la presente invención para generar proteínas de fusión. La fusión no debe ser necesariamente directa, pero puede ocurrir a través de secuencias enlazadoras.

25 También se describen composiciones comprendiendo proteínas fusionadas o conjugadas a otros dominios de anticuerpos diferentes de las regiones variables. Por ejemplo, las proteínas pueden fusionarse o conjugarse a una región Fe del anticuerpo, o parte de la misma. La parte del anticuerpo fusionada a una proteína puede comprender la región constante, región de bisagra, dominio CH1, dominio CR2, y dominio CH3 o cualquier combinación de dominios enteros o partes de los mismo. Las proteínas también pueden fusionarse o conjugarse con las partes del anticuerpo de arriba para formar multímeros. Por ejemplo, las partes de Fe fusionadas con las proteínas pueden formar dímeros a través de la unión de disulfuro entre las partes de Fe. Pueden hacerse formas multiméricas más altas fusionando las proteínas a partes de IgA y IgM. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar las proteínas a partes de anticuerpos. Véase, p. ej., las patentes estadounidenses nos. 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; publicaciones PCT WO 96/04388; WO 9 1/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341.

40 5.7 Conjugados y proteínas de fusión

Como se ha tratado, *supra*, los anticuerpos de la invención comprenden proteínas que enlazan con CD30 y ejercen un efecto citostático y/o citotóxico en células de HD, y estos se fusionan o conjugan después con proteínas heterólogas o agentes citotóxicos.

45 La presente invención proporciona por tanto un tratamiento para la enfermedad de Hodgkin mediante la administración de un anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de la invención incluyen pero no se limitan a: los anticuerpos AC10 y HeFi-1 y análogos y derivados de los mismos (p. ej., como se describe en este caso arriba);

50 En formas de realización determinadas de la invención, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente para mejorar sus propiedades citotóxicas y/o citostáticas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede administrarse como un conjugado. Fracciones particularmente adecuadas para la conjugación con anticuerpos de la invención son agentes quimioterapéuticos, enzimas de conversión a profármacos, isótopos radiactivos o compuestos, o toxinas. De forma alternativa, un ácido nucleico puede modificarse para acoplar funcionalmente la secuencia codificante de una enzima de conversión a profármaco con la secuencia codificante de un anticuerpo de la invención, de manera que una proteína de fusión que comprende la enzima de conversión a profármaco funcionalmente activa y el anticuerpo de la invención se expresa en el sujeto bajo la administración del ácido nucleico conforme a los métodos de la terapia genética descritos en la sección 5.7, *infra*.

60 En una forma de realización, un anticuerpo de la invención se fusiona con una secuencia marcadora, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En formas de realización preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros identificativos peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemagglutinin de la gripe (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767) y la marca "flag". Proteínas de fusión de este tipo pueden generarse por métodos recombinantes estándar conocidos por los de expertos en la técnica.

En otra forma de realización, los anticuerpos de la invención se fusionan o conjugan con un agente terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (p. ej., un agente citostático o citocidal), o un radionucleido (p. ej., alfa-emisores tales como, por ejemplo, ^{212}Bi , ^{211}At , o beta-emisores tales como, por ejemplo, ^{131}I , ^{90}Y , o ^{67}Cu).

5

Fármacos tales como metotrexato (Endo *et al.*, 1987, *Cancer Research* 47:1076-1080), daunomicin (Gallego *et al.*, 1984, *Int. J. Cancer* 33:737-744), mitomicina C (MMC) (Ohkawa *et al.*, 1986, *Cancer Immunol. Immunother.* 23:81-86) y alcaloides vinca (Rowland *et al.*, 1986, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-187) se han unido a anticuerpos y los conjugados derivados se han utilizado en un estudio sobre actividades antitumorales. Se debería tener cuidado en la generación de conjugados de agentes quimioterapéuticos para asegurar que la actividad del fármaco y/o de anticuerpos no disminuye como resultado del proceso de la conjugación.

10

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen las siguientes clases no mutuamente exclusivas de agentes quimioterapéuticos: agentes alquilantes, antraciclina, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, agentes de antitubulina, auristatinos, sensibilizadores a la quimioterapia, ligandos de unión al surco menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, duocarmicinas, etoposidas, pirimidinas fluorinadas, lexitropsinas, nitrosoureas, platinóles, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a la radiación, esféroides, taxanas, inhibidores de topoisomerasa, y alcaloides de vinca. Ejemplos de quimioterapia individual que se puede conjugar a un ácido nucleico o proteína de la invención incluyen pero no se limitan a un andrógeno, antramycin (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfano, sulfoximina butionina, camptotecina, carboplatina, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucil, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citochalasin B, dacarbazina, dactinomycin (antiguamente actinomycin), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodeoxiuridina, 5-fluorouracil, gramicidina D, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramycin, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, streptozotocina, tenoposido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26. En una forma de realización preferida, el agente quimioterapéutico es auristatin E. En una forma de realización más preferida, el agente quimioterapéutico es el AEB derivado de auristatin E (como se describe en la solicitud norteamericana n.º. 09/845.786 solicitada el 30 de Abril de 2001).

15

20

25

Los conjugados de la invención usados para aumentar el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención incluyen agentes terapéuticos no tradicionales tales como toxinas. Las toxinas de este tipo incluyen, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica.

30

Las técnicas para conjugar tales fracciones terapéuticas con anticuerpos se conocen bien, véase, p. ej., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2a ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58.

35

40

De forma alternativa, un anticuerpo de la invención puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado como se describe por Segal en patente estadounidense n.º. 4.676.980.

45

Como se ha mencionado anteriormente, en formas de realización determinadas de la invención, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con una enzima de conversión a profármaco. La enzima de conversión a profármaco puede expresarse como una proteína de fusión con o conjugada con un anticuerpo de la invención. Enzimas de conversión a profármaco ejemplares son carboxipeptidasa G2, beta-glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitroreductasa y carboxipeptidasa A.

50

5.8 Terapia genética

55

También se describen ácidos nucleicos que se administran para tratar, inhibir o prevenir la HD. La terapia genética se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. Los ácidos nucleicos producen sus proteínas codificadas que median un efecto terapéutico.

60

Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia genética disponibles en la técnica. Abajo se describen métodos ejemplares. Para revisiones generales de los métodos de terapia genética, véase, Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 1, 1(5):155-215. Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegl, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

65

En un aspecto preferido, la terapia comprende secuencias de ácidos nucleicos codificando un anticuerpo, dichas secuencias de ácidos nucleicos siendo parte de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o pro-

teínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras del mismo en un huésped adecuado. En particular, tales secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores operativamente enlazados a la región codificante de anticuerpos, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico para el tejido. En otra forma de realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las cuales las secuencias codificantes de anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada se rodean de regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, suministrando de este modo una expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438. En formas de realización específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; de forma alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias codificando tanto la cadena pesada como la ligera, o fragmentos de lo mismo, del anticuerpo.

La administración de los ácidos nucleicos en un paciente puede ser o bien directa, en cuyo caso el paciente está directamente expuesto al ácido nucleico o a vectores portadores de ácido nucleico, o bien indirecta, en cuyo caso, en primer lugar las células se transforman con los ácidos nucleicos *in vitro*, y después se transplantan en el paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia genética *in vivo* o *ex vivo*.

En una forma de realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Este se puede realizar por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo construyendo estos como parte de un vector de expresión del ácido nucleico apropiado y administrando el vector de modo que las secuencias de ácidos nucleicos se vuelven intracelulares. Se pueden administrar vectores de terapia genética por infección usando retrovíricos defectuosos o atenuados u otros vectores víricos (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º. 4.980.286); la inyección directa de ADN desnudo; el uso del bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, Dupont); el revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes; la encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; la administración en conexión con un péptido conocido por introducirse en el núcleo; la administración en conexión con un sujeto de ligando para una endocitosis mediada por un receptor (véase, p. ej., Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (lo cual puede utilizarse para tipos de células objetivo expresando específicamente los receptores); etc. En otra forma de realización, se pueden formar complejos de ligando de ácido nucleico en los que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para disgregar endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra forma más de realización, el ácido nucleico puede marcarse como objetivo *in vivo* para obtener una absorción y una expresión celular específicas, marcando como objetivo un receptor específico (véase, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/06 180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188, y WO 93/20221). De forma alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión por recombinación homóloga (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438).

En una forma de realización específica, se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácidos nucleicos codificando un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede usarse un vector retrovírico (véase Miller *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos codificando el anticuerpo para su uso en terapia genética se clonan en uno o más vectores, facilitando de ese modo la administración del gen en un paciente. Se pueden encontrar más detalles sobre vectores retrovíricos en Boesen *et al.*, 1994, Biotherapy 6:29 1-302, que describe el uso de un vector retrovírico para administrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas para hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en terapia genética son: Clowes *et al.*, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein *et al.*, 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin, in Genetics and Devel. 3:110-114.

Otro enfoque hacia la terapia genética implica transferir un gen, p. ej. un gen AC10 o HeFi-1, a células en cultivo de tejido por métodos tales como por electroporación, lipofección, transfección mediante fosfato cálcico, o infección vírica. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan después bajo selección para aislar las células que han absorbido y están expresando el gen transferido. Estas células se administran después a un paciente.

En esta forma de realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitándose a la transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago conteniendo las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia de gen mediante cromosoma, transferencia de gen mediante microcélula, fusión de esferoplasto, etc. Numerosas técnicas son conocidas en la técnica para la introducción de genes foráneos en células (véase, p. ej., Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29: 69-92) y pueden usarse a condición de que las funciones desarrollables y fisiológicas necesarias de las células receptoras no se interrumpan. La técnica debería proveer la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferiblemente hereditable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente por diferentes métodos conocidos en la técnica. Los glóbulos rojos recombinantes (p. ej., las células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran

ES 2 339 333 T3

preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para el uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede determinarse por un experto en la técnica.

5 Las células en las cuales puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia genética comprenden cualquier tipo de célula deseada y disponible, e incluyen pero no se limitan a fibroblastos; glóbulos rojos tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diferentes vástagos o células progenitoras, en particular células madre hematopoyéticas o progenitoras, p. ej., como se obtienen a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

10 En una forma de realización preferida, la célula usada para terapia genética es autóloga para el paciente.

En una forma de realización en la cual se usan células recombinantes en terapia genética, se introducen en las células secuencias de ácidos nucleicos codificando un anticuerpo de manera que éstas son expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran después *in vivo* para conseguir un efecto terapéutico. En una forma de realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que se puede aislar y mantener *in vitro* puede usarse de forma potencial conforme a esta forma de realización de la presente invención (véase p. ej. la publicación PCT WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A.229; y Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

20 En una forma de realización específica, el ácido nucleico a introducirse con fines de terapia genética comprende un promotor inducible operativamente enlazado a la región codificante, de manera que la expresión del ácido nucleico es controlable al controlar la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

Los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención se analizan preferiblemente *in vitro*, y luego *in vivo* para obtener la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes del uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica o profiláctica de un anticuerpo o composición farmacéutica incluyen determinar el efecto del anticuerpo o composición farmacéutica en una línea celular de Hodgkin o una muestra de tejido de un paciente con la enfermedad de Hodgkin. El efecto citotóxico y/o citostático del anticuerpo o composición en la línea celular de Hodgkin y/o muestra de tejido puede determinarse utilizando técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Un método preferido, descrito en la sección 6 abajo, implica poner en contacto un cultivo de la línea celular de la enfermedad de Hodgkin desarrollada en una densidad de aproximadamente 5.000 células en 0,33 cm² de área de cultivo durante un periodo de 72 horas con el anticuerpo o composición farmacéutica, exponer el cultivo a 0,5 μ Ci de ³H-timidina durante las 8 horas finales de dicho periodo de 72 horas, y medir la incorporación de ³H-timidina en células del cultivo. El anticuerpo o composición farmacéutica tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin y es útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Hodgkin si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular de la enfermedad de Hodgkin cultivadas bajo las mismas condiciones pero sin estar en contacto con el anticuerpo o composición farmacéutica. De forma alternativa, ensayos *in vitro* que pueden usarse para determinar si está indicada la administración de un anticuerpo específico o composición farmacéutica, incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que se cultiva una muestra de tejido de un paciente con la enfermedad de Hodgkin, y se expone a o de otra manera un anticuerpo o composición farmacéutica, y se observa el efecto de tal compuesto sobre la muestra de tejido de Hodgkin.

5.9 Administración y composiciones terapéuticas/profilácticas

45 También se describen métodos de tratamiento y profilaxis por la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de anticuerpo enlazante a CD30 que tiene un efecto citotóxico o citostático en células de la enfermedad de Hodgkin (es decir, un anticuerpo de la invención), una composición farmacéutica comprendiendo un anticuerpo de la invención (de ahora en adelante, un fármaco de la invención). Según la presente invención, el tratamiento de la HD comprende el tratamiento de pacientes ya diagnosticados como portadores de la HD en cualquier fase clínica; tal tratamiento dando como resultado un retraso en el crecimiento del tumor; y/o promoviendo la regresión tumoral.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo monoclonal AC10 o HeFi-1 o un fragmento o derivado. En un aspecto preferido, un fármaco de la invención comprende un anticuerpo sustancialmente purificado de la invención (p. ej., sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseados). El sujeto es preferiblemente un animal, incluyendo pero no limitándose a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero, y de la forma más preferible un humano.

60 Formulaciones y métodos de administración que puede emplearse se describen arriba; pueden seleccionarse formulaciones adicionales apropiadas y vías de administración de entre las descritas aquí abajo.

Diferentes sistemas de administración son conocidos y pueden utilizarse para administrar un anticuerpo de la invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar endocitosis mediante el receptor del anticuerpo (véase, p. ej., Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovírico u otro vector, etc. Métodos de introducción incluyen pero no se limitan a, vías intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, subcutáneas, intranasales, epidurales, y orales. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por

ES 2 339 333 T3

ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes quimioterapéuticos (véase la Sección). La administración puede ser sistémica o local.

5 En una forma de realización específica, puede ser deseable administrar el anticuerpo de la invención por inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo una membrana, tal como una membrana sialástica, o una fibra. Preferiblemente, al administrar un anticuerpo de la invención, se debe tener cuidado al usar materiales los cuales el anticuerpo no absorbe.

10 En otra forma de realización, el anticuerpo o composición puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat *et al.*, 1989, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase generalmente, *ibid.*)

15 En otra forma más de realización, el anticuerpo o composición puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, se puede usar una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra forma de realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, 1974, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, 1984, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York; Ranger and Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105).

Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langen, 1990 *Science* 249:1527-1533.

25 Donde se administra un ácido nucleico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión del ácido nucleico apropiado y administrándola de modo que se vuelva intracelular, p. ej., usando un vector retroviral (véase la patente estadounidense n°. 4.980.286), o por inyección directa, o usando el bombardeo de micropartícula (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o revistiendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándola en conexión con un péptido de tipo homeobox conocido por introducirse en el núcleo (véase p. ej., Joliet *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 88:1864-1868), etc. De forma alternativa, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, por recombinación homóloga.

35 Como se alude a lo anterior, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas (fármacos de la invención). Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o de un gobierno estatal o catalogada en la Farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el terapéutico. Tales portadores de fármacos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición del fármaco se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes para fármacos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de humidificación o agentes emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden coger la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con ligantes tradicionales y soportes tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato magnésico, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Composiciones de este tipo contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

60 En una forma de realización preferida, el fármaco de la invención se formula conforme a procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa en seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, el fármaco de la invención también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para calmar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran bien separadamente o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o sachete indicando la cantidad de agente activo. Donde se haya de administrar el fármaco de la invención por infusión, éste puede dispensarse con una botella de infusión conteniendo agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Donde el fármaco de la

invención se administre por inyección, puede proveerse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La cantidad de anticuerpo de la invención que será eficaz en el tratamiento o prevención de HD puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se debe emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y de la fase de la HD, y debería decidirse según la decisión del profesional y las circunstancias de cada paciente. Se pueden extrapolar dosis eficaces a partir de curvas de respuesta según la dosis derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o en un modelo animal.

5.10 Equipos

También se describe un paquete o equipo farmacéutico comprendiendo uno o más recipientes llenados con un anticuerpo de la invención y opcionalmente con uno o más portadores farmacéuticos. Opcionalmente asociado a tal(es) contenedor(es) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental regulando la manufactura, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la manufactura, el uso o venta para la administración humana.

En una forma de realización, un equipo comprende un anticuerpo purificado de la invención. El anticuerpo puede conjugarse a un agente radionucleído o quimioterapéutico. El equipo comprende además opcionalmente un portador farmacéutico.

5.11 Dosis efectiva

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, p. ej., para determinar el LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de la dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los anticuerpos que exhiben índices terapéuticos grandes. A pesar de que se pueden usar anticuerpos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado al diseñar un sistema de administración que fije como objetivo tales anticuerpos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial hacia las células no infectadas y, de ese modo, reduzca los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios animales pueden usarse formulando un rango de dosificación para el uso en seres humanos. La dosificación de tales anticuerpos se sitúa preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con toxicidad pequeña o nula. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un rango de concentración del plasma circulante que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue una inhibición media-máxima de los síntomas) como se ha determinado en el cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con más precisión la dosis útil en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento.

Generalmente, la dosificación de un anticuerpo de la invención en un fármaco de la invención administrado a un paciente con la enfermedad de Hodgkin es típicamente de 0,1 mg/kg para 100 mg/kg de la masa corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de la masa corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg para 10 mg/kg de la masa corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria para las proteínas foráneas. Así, son frecuentemente posibles dosificaciones inferiores de anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos y una administración menos frecuente.

5.12 Formulaciones

Composiciones farmacéuticas para el uso conforme a la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables.

Así, los anticuerpos pueden formularse para la administración por inhalación o insuflación (bien a través de la boca o la nariz) o la administración oral, bucal, parenteral o rectal.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o metilcelulosa de hidroxipropilo); productos de relleno (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno de calcio) lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (p. ej., almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes de humidificación (p. ej., sulfato de lauril de sodio). Los comprimidos pueden revestirse por métodos bien conocidos en la técnica. Preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o éstas pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u otros vehículos

adecuados antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., metilo o propilo-P-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.

Las preparaciones para la administración oral pueden formularse adecuadamente para ofrecer una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los anticuerpos para el uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en spray de aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse mediante una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para el uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuado tal como lactosa o almidón.

Los anticuerpos pueden formularse para la administración parenteral por inyección, p. ej., por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para la inyección pueden presentarse en forma de dosis únicas, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, la sustancia activa puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógeno, antes de su uso.

Los anticuerpos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases supositorias convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los anticuerpos también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de efecto duradero pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los anticuerpos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de cambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias conteniendo la sustancia activa. El paquete puede comprender por ejemplo metal u hoja plástica, tal como un blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede acompañarse por instrucciones para la administración preferiblemente para la administración a un humano.

5.13 *Terapia combinatoria para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin*

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse junto con el tratamiento con irradiación o uno o más agentes quimioterapéuticos.

Para el tratamiento de irradiación, la irradiación puede ser de rayos gamma o rayos X. Para una vista de perspectiva general de la terapia de radiación, véase Hellman, Capítulo 12: "Principles of Radiation Therapy Cancer", en: "Principles and Practice of Oncology", DeVita *et al.*, eds., 2a. Ed., J.B. Lippencott Company, Philadelphia.

Clases útiles de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes clases no mutuamente exclusivas de agentes: agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, agentes de antitubulina, auristatinas, sensibilizadores a la quimioterapia, ligandos de unión al surco menor de ADN, inhibidores de la replicación de ADN, duocarmicinas, etoposidas, pirimidinas fluorinadas, lexitropsinas, nitrosoureas, platinóles, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a la radiación, esferoides, taxanes, inhibidores de topoisomerasa, y alcaloides de vinca. La quimioterapia individual comprendida por la invención incluye pero no se limita a un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicino, busulfano, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinosida, citochalasin B, dacarbazina, dactinomicina (antiguamente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodeoxiuridina, 5 fluorouracil, gramicidina D, hidroxíurea, idarubicino, ifosfamida, irinotecano, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicin, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazola, paclitaxel, plicamicin, procarbina, streptozotocina, tenoposida, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

En una forma de realización específica, un anticuerpo de la invención se administra al mismo tiempo con terapia de radiación o uno o más agentes quimioterapéuticos. En otra forma de realización específica, la quimioterapia o terapia

de radiación se administra antes o después de administrar un anticuerpo de la invención, durante al menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, o tres meses, antes o después de administrar un ácido nucleico o una proteína de la invención.

5 En una forma de realización específica en la que un anticuerpo de la invención se conjuga a una enzima de conversión a profármaco, el anticuerpo se administra con un profármaco. La administración del profármaco puede ser simultánea a la administración del anticuerpo de la invención, o, más preferiblemente, posterior a la administración del anticuerpo de la invención tras al menos una hora hasta una semana, por ejemplo aproximadamente cinco horas, 12 horas, o un día. Dependiendo de la enzima de conversión a profármaco administrada, el profármaco puede ser
10 una mostaza de ácido benzoico, una mostaza anilínica, una mostaza de fenol, mostaza-glucuronida de p-hidroxianilina, epirubicin-glucuronida, fenoxiaceril de adriamicina-N,N-(4'-hidroxifenil acetil)-palitoxin doxorubicina, melfalán, cefalosporina de mostaza de nitrógeno, β -fenilenodiamina, cefalosporina derivada de vinblastina, mostaza de cefalosporina, ácido cianofenilmetil- β -d-gluco-piranosidurónico, 5(adaridin-1-il)2,4-dinitrobenzamida, o alanina de metotrexato.

15 La invención se describe posteriormente en los ejemplos siguientes los cuales no pretenden limitar el ámbito de la invención.

20 6. Ejemplo: Los anticuerpos monoclonales anti-CD30 AC10 y HeFi-1 inhiben el crecimiento de las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin que expresan CD30

6.1 Materiales y métodos

25 *Células y condiciones de cultivo:* las líneas celulares que expresan CD30, L540, HDLM2; L428, KM-H2 y Karpas 299. se obtuvieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células/DSMZ en Braunschweig, Alemania. La línea celular de Hodgkin L540cy fue proporcionada por el Dr. V. Diehl de la Universidad de Colonia, Colonia, Alemania. Las líneas celulares se mantuvieron en las formulaciones de medios recomendados y se subcultivaron cada 3-4 días.

30 *Reactivos y anticuerpos:* la línea de hibridoma del anticuerpo monoclonal Anti-CD30 AC10 se describió por Bowen *et al.* (Bowen *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:5896-5906) y se proporcionó por el Dr. E. Podack, Universidad de Miami. El anticuerpo purificado se aisló de los sobrenadantes sin suero usando una columna de inmunoafinidad de proteína G. El anticuerpo AC10 resultante se determinó como > 97% monomérico por cromatografía por exclusión de tamaño. El anticuerpo monoclonal HeFi-1 se ha descrito previamente y fue proporcionado por el Dr. T. Hecht, NCI, Bethesda, MD. Se demostró por cromatografía por exclusión de tamaño que el mAb de HeFi-1 era mayor del 98% de monómero.

40 *Ensayos de proliferación:* las líneas celulares que expresan CD30 se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 50.000 o 5.000 células/pocillo en medios de crecimiento (RPMI con un 10% de suero fetal bovino (FBS) para las líneas celulares L428, KM-H2 y Karpas 299, y RPMI/20%FBS para las líneas celulares HDLM-2 y L540. Las líneas celulares se cultivaron en ausencia o en presencia mAbs anti-CD30 soluble reticulados o de mAbs anti-CD30 inmovilizados, como se describe abajo.

45 *Reticulación de anticuerpos en la solución:* Para reticular los anticuerpos anti-CD30 en la solución, diferentes diluciones de AC10 o HeFi-1 se valoraron placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos en ausencia o en presencia de 20 μ g/ml de anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratón. Las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin se añadieron después a las placas a o bien 50.000 o 5.000 células/pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas y se marcaron con 3 H-timidina, 1 μ Ci/pocillo, durante las 5 horas finales.

50 *Inmovilización de anticuerpos:* La inmovilización de anticuerpos se obtuvo revestiendo los pocillos con anticuerpo en tampón Tris de 50 mmol/L (pH 8.5) durante 18 horas a 4°C. Antes de la adición de células, los pocillos se lavaron dos veces con PBS para eliminar el mAb no unido. En cada pocillo se añadieron 50.000 o 5.000 células en un volumen total de 200 μ l. La proliferación se determinó por la absorción de 3 H-timidina (0.5 μ Ci/pocillo) durante las 8 horas finales de un periodo de cultivo de 72 horas.

6.2 Resultados

60 Para evaluar la actividad biológica de los mAbs anti-CD30, se cultivaron líneas celulares de HD expresando CD30 (50.000 células/pocillo) en presencia del mAb anti-CD30 inmovilizado AC10. El mAb AC10 demostró la inhibición del crecimiento celular de líneas de HD de tipo células T (L540 y HDLM-2) o tipo célula B (L428 y KM-H2) (Fig. 1). Ki-1, que mostró previamente no tener ningún efecto en las líneas celulares de HD (Gruss *et al.*, 1996, Blood 83:2045-2056), se usó como un control.

65 Para seguir evaluando la actividad de AC10, se realizó una segunda serie de ensayos. Para valorar la actividad de AC10 durante un periodo de crecimiento de la célula tumoral logarítmico, se disminuyó la densidad de la célula de los cultivos para proporcionar condiciones de crecimiento más óptimas. Para ese fin, las líneas celulares de HD se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 5.000 células/pocillo en presencia o en ausencia

del mAb AC10. AC10 demostró una inhibición del crecimiento de las cuatro líneas celulares de HD evaluadas (L540, HDLM-2, L428 y KM-H2; Fig. 2).

En otro conjunto de experimentos, las líneas celulares de HD se incubaron con AC10 o HeFi-1 solubles que se habían reticulado en solución mediante la adición de anticuerpos solubles de cabra anti-IgG de ratón. Bajo estas condiciones de reticulación, las cuatro líneas celulares HD, al colocarse en placas a 5×10^4 células/pocillo, se les inhibió el crecimiento con AC10 y HeFi-1 (Fig. 3). Cuando las células se colocaron en placas a 5×10^3 células/pocillo, AC10 inhibió el crecimiento de HDLM-2; L540, y L428 y, en una extensión menor, la línea celular KM-H2, puesto que HeFi-1 inhibió el crecimiento de las líneas celulares HDLM-2, L540, y L428 (Fig. 4).

Los datos resultantes de los experimentos probando los efectos de AC10 y HeFi-1 en líneas celulares tumorales que expresan CD30 se resumen en la Tabla 2, *infra*. La Tabla 2 también proporciona una comparación de la actividad anti-tumoral de AC10 y HeFi-1 con la del mAb M44.

TABLA 2

Actividad citostática y/o citotóxica de señalización de los mAbs anti-CD30 en líneas celulares malignas expresando CD30

Línea Celular	Tipo Celular	Inhibición del Crecimiento por		
		M44a	HeFi-1	AC10
Karpas 299	ALCL	+	+	+
Michel	ALCL	+	ND	ND
KM-H2	HD (fenotipo de célula B)	-	+	+
L428	HD (fenotipo de célula B)	-	+	+
HDLM-2	HD (fenotipo de célula T)	-	+	+
L540	HD (fenotipo de célula T)	-	+	+

^a Datos publicados por Gruss et al, Blood 83(8):2045-2056

Tomados juntos, estos datos indican que los mAbs AC10 y HeFi-1 se distinguen de los mAbs anti-CD30 previamente descritos por su capacidad para inhibir el crecimiento de líneas de HD expresando CD30. Es de interés tener en cuenta que Hubinger *et al.* recientemente evaluó la actividad del mAb anti-CD30 M44, en forma inmovilizada, en un ensayo de proliferación utilizando 5.000 células/pocillo. Bajo estas condiciones, M44 inhibió el crecimiento de la línea ALCL expresando CD30, Karpas 299 pero no la línea celular de HD HDLM-2 (Hubinger *et al.*, 1999, Exp. Hematol. 27(12): 1796-805).

7. AC10 aumenta el efecto citotóxico de la quimioterapia en las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin

7.1 Materiales y métodos

Las células L428 se cultivaron durante 24 horas en presencia o en ausencia de $0.1 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CD30, AC10, reticulado por la adición de $20 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón. Después del periodo de cultivo de 24 horas, las células se cosecharon y lavaron con suero salino tamponado con fosfato (PBS). Las células se colocaron después en placas de cultivo de 96 pocillos de tejido de fondo plano en 5×10^3 células/pocillo y se mezclaron con diferentes diluciones de fármacos quimioterapéuticos. Después de 1 hora de exposición a los fármacos las células se lavaron dos veces, y después se añadieron medios de cultivo nuevos. Las placas se incubaron entonces a 37°C durante 72 horas y seguidamente se incubaron durante 4 horas con $0.5 \mu\text{Ci/pocillo}$ de ^3H -timidina. La inhibición del crecimiento se determinó comparando la cantidad de ^3H -timidina incorporada en células tratadas con la cantidad incorporada en células de control no tratadas.

7.2 Resultados

Para evaluar el efecto del mAb anti-CD30 en combinación con fármacos quimioterapéuticos, las células L428 se incubaron durante 24 horas o bien en ausencia del anticuerpo o en presencia de AC10 en $0.1 \mu\text{g/ml}$ con $20 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón para proporcionar la reticulación para el anticuerpo primario. Después de

ES 2 339 333 T3

esta incubación las células se colocaron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en 5×10^3 células/pocillo en presencia de diluciones de fármacos quimioterapéuticos incluyendo doxorubicina, cisplatina, y etoposida (Tabla 3). El EC50, concentración de fármaco necesario para inhibir la incorporación de ^3H -timidina en un 50% en comparación con las células de control no tratadas, se determinó entonces para las células tratadas solamente con los fármacos o con las combinaciones de fármaco y anticuerpo. Para la doxorubicina, la incubación con AC10 disminuyó el EC50 en células L428 (es decir, disminuyó la cantidad de fármaco necesario para inhibir el 50% de la síntesis de ADN) de aproximadamente 45 nm (doxorubicina sola) hasta aproximadamente 9nM, para la cisplatina el AC10 disminuyó el EC50 de 1.500 nm hasta 500 nm, y para la etoposida el AC10 disminuyó el EC50 de 1.500 nm hasta 600 nm.

TABLA 3

El AC10 aumenta la eficacia de fármacos quimioterapéuticos en la línea celular de HD L428

Fármaco	EC ₅₀ , nM	
	sin AC 10	con AC10
Doxorubicina	45	9
Cisplatina	1.500	500
Etoposida	1.500	600

8. Actividad antitumoral de AC10 y HeFi-1 en xenotransplantes de la enfermedad de Hodgkin L540cy diseminados y localizados (subcutáneo)

8.1 Materiales y métodos

Modelos de xenotransplante de tumor humano: Ratones SCID C.B-17 hembra, obtenidos a través de Taconic (Germantown, NY) con 4-6 semanas de edad, se usaron para todos los estudios de eficacia. Para establecer modelos de xenotransplante de la enfermedad de Hodgkin, se recogieron células L540cy (HD) de un cultivo celular, se lavaron en suero salino tamponado con fosfato helado (PBS), se resuspendieron en PBS, y se mantuvieron en hielo hasta la implantación. Para modelos de la enfermedad diseminados, a los ratones se les inyectó 10^7 células de L540cy por vía intravenosa a través de la vena caudal. Se establecieron xenotransplantes de tumor sólidos inyectándoles a los ratones subcutáneamente (s.c.) 2×10^7 de células L540cy. Para la evaluación terapéutica se utilizaron las dosis de tratamiento indicadas.

La administración de AC10 y HeFi-1: Los ratones Diseminado portadores del tumor L540cy diseminado recibieron 10^7 células a través de la vena caudal en d0 y seguidamente se inició una terapia en d1. Los ratones tratados recibieron inyecciones i.p. o bien de AC10 o de HeFi-1 cada dos días hasta un total de 10 inyecciones, q2dx10, en 1 mg/kg/inyección.

Para el modelo L540Ci subcutáneo, a los ratones se les inyectó s.c. con 2×10^7 células y se les observó a diario para analizar la formación tumoral sólida. Cuando los tumores fueron palpables, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en grupos y recibieron o bien q2dx10 de AC10 o HeFi-1 en 2 mg/kg/inyección.

8.2 Resultados

Se evaluaron AC 10 y HeFi-1 en ratones SCID xenotransplantados L540cy de la enfermedad de Hodgkin, como se ha descrito anteriormente. En la población de ratones con tumores L540Ci diseminados, todos los animales de control no tratados desarrollaron signos de enfermedad severa diseminada tales como la parálisis de brazo posterior o la formación de una masa tumoral sólida y tuvieron que sacrificarse (tiempo de supervivencia medio = 37 días). Por el contrario, todos los ratones que recibieron o bien AC10 o HeFi-1 sobrevivieron durante > 46 días sin signos de la enfermedad (Fig. 5A).

Con respecto a la población de ratones con tumores L540Ci subcutáneos, mientras los tumores de control no tratados crecieron rápidamente crecido a $> 450 \text{ mm}^3$, ambos mAbs retrasaron significativamente el crecimiento del tumor como se muestra en la Fig. 5B.

Los inventores han identificado anticuerpos monoclonales de murina (mAbs) que tienen como objetivo el receptor CD30 humano y exponen un perfil de actividad no descrito previamente para otros mAbs anti-CD30. En forma no modificada, estos anticuerpos, AC10 y HeFi-1 inhiben el crecimiento de HD y la línea de ALCL Karpas 299 y muestran actividad antitumoral *in vivo* en un modelo del xenotransplante tumoral de la enfermedad de Hodgkin.

9. Actividades *in vitro* de AC10 quimérico

9.1 Materiales y métodos

5 *Células y reactivos:* el hibridoma AC10 se desarrolló en medios RPMI-1640 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) suplementados con un 10% de suero bovino fetal. El anticuerpo se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de proteína A. Las líneas HD positivas de CD30 L540, KM-H2, HDLM-2 y L428, al igual que la línea ALCL Karpas-299, se obtuvieron a partir de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania); L540cy estuvo proporcionada por el Dr. V. Diehl; HL-60 y Daudi se obtuvieron a partir de ATCC (Manassas, VA). Se obtuvieron células CHO DG44 a partir de Lawrence Chasm (Universidad de Colombia, Nueva York, NY). La cabra anti FITC de ratón o la cabra anti FITC humano se obtuvieron a partir de Jackson Immunoresearch, (West Grove, PA.). El mAb anti-CD30 Ki-1 se obtuvo a partir de Accurate Chemicals (Westbury, NY).

15 *Análisis FACS:* para evaluar la expresión de CD30 en líneas celulares, se combinaron 3×10^5 células con niveles de saturación ($4 \mu\text{g/ml}$) de o bien AC10 o AC10 quimérico (cAC10) en un 2% de FBS/PBS helado (medios colorantes) durante 20 min en hielo y se lavaron dos veces con medios de coloración de frío de hielo para eliminar el mAb no unido. Las células se tiñeron entonces con mAbs secundarios diluidos 1:50 en medios de coloración en frío helado, anticuerpos de cabra anti FITC de ratón para AC10 o anticuerpos de cabra anti FITC humano para cAC 10, se incubaron durante 20 minutos en hielo, se lavaron como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en $5 \mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidium (PI). Las células marcadas se examinaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo fACScan de Becton Dickinson y se controlan para excluir las células no viables. Los datos se analizaron usando la versión 3.3 del software CellQuest de Becton Dickinson y la intensidad de fluorescencia del medio corregido de fondo se determinó para cada tipo célula.

25 Para la unión de saturación de anticuerpos, se combinaron 3×10^5 células de karpas 299 con concentraciones en aumento de AC10 o cAC10 diluido en medios de coloración en frío helado durante 20 minutos en hielo, se lavaron dos veces con medios de coloración en frío helado para eliminar el mAb libre y se incubaron con 1:50 de anticuerpo de cabra anti FITC de ratón o anticuerpo de cabra anti FITC humano, respectivamente. Las células marcadas se lavaron, se resuspendieron en PI y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Las intensidades de fluorescencia medias resultantes se fijaron con respecto a la concentración de mAb.

35 Para el análisis de células de posición de ciclo celular éstas se cultivaron en medios completos y se marcaron en los tiempos indicados con bromodeoxiuridina (BrdU) ($10 \mu\text{M}$ final; Sigma, St. Louis, MO) durante 20 min para detectar síntesis de ADN nacientes, y con PI para detectar el contenido de ADN total tal y como se describe anteriormente (Donaldson *et al.*, 1997, J. Immunol. Meth. 203:25-33). Las células marcadas se analizaron para obtener la posición de ciclo celular y la apoptosis por citometría de flujo usando el programa CellQuest de Becton Dickinson tal y como se describe anteriormente (Donaldson *et al.*, 1997, J. Immunol. Meth. 203:25-33).

40 *Inhibición del crecimiento *in vitro*:* La evaluación de la inhibición del crecimiento por mAbs de murina se efectuó inmovilizando el mAb a $10 \mu\text{g/ml}$ en 50 mm de tris-HCl a pH 8.5, en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de plástico durante la noche a 4°C . Las placas se lavaron dos veces con PBS para eliminar el mAb no unido y seguidamente se añadieron células en medios completos de $100 \mu\text{l}$ a 5.000 células/pocillo. Tras 48 h de incubación a 37°C , 5% de CO_2 , las células se marcaron con $^3\text{H-TdR}$ por la adición de medios completos de $50 \mu\text{l}$ conteniendo $0,5 \mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-TdR}$ durante 2 h y el nivel de síntesis de ADN determinado en relación a las células en pocillos de control no tratados. La evaluación de la inhibición del crecimiento por cAC10 se efectuó usando mAb soluble y un reticulador secundario. Las células se colocaron en placas a 5.000 células/pocillo en medios completos de $180 \mu\text{l}$ en un formato de 96 pocillos. Se añadió cAC10 en medios completos conteniendo un exceso multiplicado por 10 correspondiente de anticuerpo de cabra anti IgG humano en las concentraciones anotadas, en $20 \mu\text{l}$. A las 96 h de postincubación las células se marcaron con $^3\text{H-TdR}$ durante 4 h tras la recogida de células y el recuento de escintilaciones para cuantificar el nivel de la síntesis del ADN naciente. La inhibición del porcentaje en relación a los pocillos de control no tratados se fijó con respecto a la concentración de cAC 10.

55 *Construcción y la expresión de AC10 quimérico (cAC10):* Para la construcción de cAC10, las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera se clonaron a partir del hibridoma de AC 10 usando los métodos de Gilliland *et al.*, 1996, Tissue Antigens 47:1-20. El ARN total se aisló del hibridoma de AC10 y de ADNc de las regiones variables se generaron usando kappa de ratón y cebadores específicos del gen IgG2b. El ADN codificando la región variable (VH) de cadena pesada de AC10 se unió con la secuencia codificando la región constante de lagamma humana I (huC γ 1, número de acceso SwissProt P01857) en un vector de clonación y la región variable de cadena ligera (VL) de AC 10 se unió de forma similar a la región constante de la kappa humana (huC κ , PID G185945) en un vector de clonación separado. Tanto la secuencia quimérica de cadena pesada como la de cadena ligera se clonaron dentro de pDEF14 para la expresión de anticuerpo monoclonal quimérico intacto en células CHO. El plásmido pDEF14 utiliza el promotor del gen alfa del factor de alargamiento del hámster chino que conduce la transcripción de genes heterólogos (patente estadounidense 5.888.809) resultando en niveles altos de la expresión de proteínas recombinantes sin necesidad de amplificación génica. El plásmido resultante se designó como pDEF14-C3 (Fig. 6).

65 Para la generación de la línea celular de expresión de AC10c, pDEF14-C3 se linealizó y modificó en las células CHO DG44 por electroporación. Tras la electroporación, las células pudieron recuperarse durante dos días en medios completo DMEM/F12 conteniendo un 10% de FBS, después de lo cual los medios se sustituyeron por medios

selectivos sin hipoxantina ni timidina. Sólo aquellas células que incorporaban el ADN plásmido, lo cual incluye el gen DLIFR, pudieron desarrollarse en ausencia de hipoxantina y timidina. Se seleccionaron y cultivaron clones de título alto en biorreactores. Se purificó anticuerpo de cAC10 por proteína A, intercambio iónico, y cromatografías de interacción hidrofóbica, con el producto final determinado por hPLC-SEC en >99% de anticuerpo de monómero.

9.2 Resultados

Unión de AC10 de murina y de AC10 quimérico con líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin

El AC10 se produjo originalmente inmunizando ratones con la línea celular YT de linfoma granuloso grande positiva de CD30 y se mostró como específica para CD30 (Bowen *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:5896-5906). Antes de valorar los efectos de AC10 y AC10c en el crecimiento de células HD, se compararon los niveles de la expresión de CD30 en diferentes líneas celulares cultivadas. Las cuatro líneas de HD evaluadas se basaron en CD30-positivo en proporciones de fluorescencia de citometría de flujo (Tabla 4). La líneas celulares HD de tipo célula T HDLM-2 y L540 al igual que la línea ALCL Karpas-299 expresaron niveles altos cualitativamente similares a CD30 mientras que la expresión en dos líneas HD de tipo célula B KM-H2 y L428 fueron un tanto bajas. L540cy, un subclón de L540, mostró un nivel intermedio de expresión de CD30. Aunque la unión de cAC10 y AC10 con estas líneas celulares se detectó usando diferentes anticuerpos secundarios (anticuerpo de cabra anti-humano o anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado de FITC, respectivamente) estos datos demuestran que el proceso de quimerización no disminuyó la unión específica de cAC10 con la superficie de la célula de CD30. La línea de leucemia promielocítica HL-60 y la línea del linfoma de Burkitt Daudi fueron ambas CD30-negativas y sirvieron como controles en estudios posteriores.

Para seguir comparando la actividad de unión de los anticuerpos de murina y quiméricos, las células Karpas-299 se incubaron con titulaciones de AC10 o cAC10 y después se marcaron con anticuerpo de cabra anti FITC de ratón o anticuerpo de cabra anti FITC humano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), respectivamente, para determinar niveles requeridos para la saturación. Las células marcadas se examinaron por citometría de flujo y la intensidad de fluorescencia media se fijó contra la concentración de mAb. La saturación de unión para ambas formas de mAb tuvo lugar en 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 7). La saturación fue consistente para todas las líneas celulares positivas de CD30 examinadas (datos no mostrados) demostrando que el cAC10 retuvo la actividad de unión del anticuerpo de murina parental.

Las células mononucleares de sangre periféricas recientemente aisladas no reaccionaron con cAC10 y no mostraron ninguna señal por encima de lo ya mencionado en este ensayo. De forma similar, las células B y las células T primarias humanas aisladas no se unieron con cAC10. Las células T periféricas humanas primarias activadas con anti-CD3 y anti-CD28, y las células B activadas por el mitógeno de la hierba camín mostraron un nivel de unión bajo y transitorio de cAC10 tras 72 h de la activación, el cual disminuyó después (datos no mostrados).

Actividades in vitro de AC10 y cAC10: Anticuerpos anti-CD30 tales como M44 y M67 han mostrado tener efectos anti-proliferativos en las líneas ALCL, mientras que no tienen ningún efecto ni estimula el crecimiento de líneas HD (Gruss *et al.*, 1994, Blood 83:2045-2056; Tian *et al.*, 1995, Cancer Res. 55:5335-5341). Para evaluar inicialmente el efecto del mAb AC10 en proliferación celular de HD, se comparó AC10 con el mAb Ki-1 bajo condiciones de fase sólida proporcionadas previamente (Gruss *et al.*, 1994, Blood 83:2045-2056). Para estos estudios se inmovilizaron mAbs sobre placas de cultivo de tejido plástico antes de la adición de células HD como se describe en Materiales y Métodos. Tras la incubación durante 48 h a 37°C, las células se marcaron con $^3\text{H-TdR}$ y el nivel de síntesis de ADN se determinó en relación a las células en pocillos de control no tratados. La Figura 3A muestra que la presencia del mAb inmovilizado Ki-1 tenía efecto nominal en el crecimiento de las líneas HD. Por el contrario, la presencia de AC10 inmovilizado resultó en una inhibición del crecimiento significativa.

Tras la quimerización, se realizó una titulación de cAC10 en las líneas celulares de HD L540, L540cy y L428 al igual que la línea ALCL Karpas-299. Se añadió cAC10 en solución a las concentraciones anotadas en presencia de exceso de 10 veces de anticuerpo de cabra anti IgG humano. Se añadió anticuerpo de reticulación para potenciar los efectos de cAC10 y para aproximarse a los efectos de la reticulación mediada por FcR que podría ocurrir *in vivo*. El línea de ALCL positiva de CD30 fue altamente sensible al cAC10, con anIc50 (concentración de mAb que inhibió en un 50% el crecimiento celular) de 2 ng/ml. El líneas de HD L428, L540 y L540cy mostraron sensibilidades de IC₅₀ al cAC10 de 100 ng/ml, 80 ng/ml y 15 ng/ml respectivamente. En estudios paralelos estas células tratadas con un mAb de control y enlazador no vinculante no mostraron ninguna reducción en la síntesis de ADN sobre el rango de concentración analizado (datos no mostrados) y la línea negativa de CD30 HL-60 mostró solamente una ligera inhibición por cAC10 en el nivel máximo evaluado (Fig. 8).

Efectos del ciclo celular de cAC10: Hubinger *et al.* ha mostrado recientemente que los mAbs anti-CD30 pueden inhibir el crecimiento de las células ALCL, incluyendo Karpas-299, a través de la inducción de la detención del ciclo celular y sin inducción de la apoptosis (Hubinger *et al.*, 2001, Oncogene 20:590-598). No obstante, estos anticuerpos no causaron ningún efecto inhibitorio en células de HD, y en algunos casos estos estimularon la proliferación. Para examinar más de cerca los efectos del ciclo celular de cAC10 *in vitro*, se cultivó la línea celular de HD L540cy en medios completos conteniendo 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de cAC10 formando un complejo con anticuerpos de cabra anti IgG humano en 10 $\mu\text{g/ml}$. En los tiempos indicados, las células se marcaron con bromodeoxiuridina durante 20 min para detectar una síntesis de ADN naciente, y con yoduro de propidio para detectar el contenido de ADN total. Las células marcadas se analizaron para averiguar la posición del ciclo celular por citometría de flujo usando el programa Cellfit de Becton Dickinson tal y como se describe anteriormente (Donaldson *et al.*, 1997, J. Immunol: Meth. 203:25-33).

La Fig. 9 muestra un cambio representativo en el contenido de ADN y la síntesis de ADN en las células de HD de L540ci tras la exposición a cAC10. El porcentaje de la población en cada región se cuantificó como se describe en la sección 9.1 y se mostró en la Tabla 5. La exposición de L540cy a cAC10 resulta en una pérdida dependiente del tiempo de las células de la fase S desde un 40% en la población no tratada hasta un 13% a los 2 días (tras la exposición). De forma coordinada, el contenido de G1 de esta población aumentó de un 40% en células no tratadas a un 65% a los 3 días (tras la exposición). La región de menos del contenido de G1 da una indicación precisa de las células apoptóticas que experimentan una fragmentación de ADN (Donaldson *et al.*, 1997, *J. Immunol. Meth.* 203:25-33) y esta población aumentó de un 6% en la población no tratada a un 29% a las 48 h tras la exposición a cAC10. Estos estudios citométricos de flujo fueron corroborados por un ensayo paralelo de exclusión del colorante usando un hemocitómetro. Como al medirse por exclusión de colorante, las células L540cy no tratadas tuvieron un 93% de viabilidad y ésta disminuyó a un 72% a las 48 h tras la exposición a cAC10. Las células karpas tratadas con cAC10 mostraron una reducción similar en la fase S desde el 40% al 11% a las 48 h post-cAC10 (Tabla 5). En estudios de control, la línea de células B negativa de CD30 Daudi sólo mostró la modulación nominal del ciclo celular y no mostró ningún aumento en la apoptosis tras el tratamiento siguiente con cAC10 (Tabla 5). Estudios previos diferentes en los cuales mAb inmovilizado para CD30 indujo a la apoptosis en células ALCL (Mir *et al.*, 2000, *Blood* 96:4307-43 12.), se observó de pequeña a ninguna apoptosis en estas células con cAC10 soluble y un anticuerpo secundario de reticulación. Tomados juntos, estos datos demuestran una detención del crecimiento inducida de cAC10 y la acumulación de la población de G1 y la disminución de la fase S en ambas líneas positivas de CD30, y la inducción de la apoptosis en las células HD L540cy *in vitro*.

TABLA 4

Unión de AC10 y cAC10 con diferentes líneas celulares

Línea Celular	Lineage ^a	MFI ^b		Proporciones de Unión ^c	
		AC10	cAC10	AC10	cAC10
HDLM2	Enfermedad de Hodgkin (de tipo célula T)	507.2	591.8	156	176
L540	Enfermedad de Hodgkin (de tipo célula T)	435.8	582.5	183	251
L540cy	Enfermedad de Hodgkin (de tipo célula T)	363.3	495.9	120	156
Karpas	Linfoma Anaplástico de Célula Grande	399.9	579.2	158	176
KM-H2	Enfermedad de Hodgkin (de tipo célula B)	102.0	105.8	33	41
L428	Enfermedad de Hodgkin (de tipo célula B)	174.4	186.0	67	67
HL60	Leucemia Mielógena Aguda	1.0	3.8	1	2
Daudi	Linfoma de Burkitt de células B	-0.6	0.9	1	1

^a Gruss et al., 1994
^b Intensidad de Fluorescencia Media
^c Las proporciones de unión se determinaron dividiendo la intensidad de fluorescencia media geométrica de las células manchadas con (AC10 o cAC10 en 4µg/ml) primario y un conjugado de FITC (anticuerpo de cabra anti-Ig de cabra o humano respectivamente) secundario apropiado, mediante la intensidad de fluorescencia media geométrica de las células manchadas solamente con el respectivo anticuerpo secundario.

ES 2 339 333 T3

TABLA 5
Efectos del ciclo celular de cAC10

<u>L540cy</u>				
	No Tratadas	24 h	48 h	72 h
% G1	40	52	51	65
% S	40	21	13	17
% G2/M	13	5	5	7
% Apop.	6	20	29	10
<u>Karpas299</u>				
% G1	41	71	64	59
% S	40	7	11	17
% G2/M	15	17	10	11
% Apop.	2	5	12	10
<u>Daudi</u>				
% G1	25	26	24	25
% S	53	41	53	53
% G2/M	13	16	12	13
% Apop.	7	14	8	7

10. Eficacia in vivo de AC10 quimérico contra xenotransplantes de la enfermedad de Hodgkin

10.1. *Materiales y métodos*

Modelos de xenotransplantes de la enfermedad de Hodgkin humana: Para el modelo de la HD diseminada, se inyectaron 1×10^7 de células L540cy a través de la vena caudal en ratones SCID C.B-17. El tratamiento con cAC10 se inició en los tiempos indicados y se administró mediante inyección intraperitoneal cada cuatro días hasta un total de 5 inyecciones. Los animales se evaluaron a diario para detectar síntomas de la enfermedad diseminada, en particular la parálisis en la extremidad posterior. Los ratones que desarrollaron estos u otros síntomas de la enfermedad se sacrificaron después. Para el modelo localizado de HD, las células L540cy se implantaron con 2×10^7 células en el flanco adecuado de los ratones SCID. La terapia con cAC10 se inició cuando el tamaño tumoral en cada grupo de 5 animales alcanzó un promedio de $\sim 50 \text{ mm}^3$. El tratamiento consistió en inyecciones intraperitoneales de cAC10 cada 4 días hasta 5 inyecciones. El tamaño tumoral se determinó usando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

10.2 *Resultados*

La actividad *in vivo* de cAC10 se evaluó en los ratones SCID usando células L540cy. El establecimiento de modelos de HD humanos en ratones ha demostrado ser difícil. Diferentes líneas celulares derivadas de la HD que dan un injerto muy pobre en ratones inmunodeficientes, pueden establecerse exitosamente modelos de células tumorales de HD L540cy en ratones SCID (Kapp *et al.*, 1994, Ann Oncol. 5Suppl 1:121-126). Se usaron dos modelos diferentes de la enfermedad que utilizan células L540cy, un modelo diseminado, y un modelo tumoral subcutáneo localizado para evaluar la eficacia del cAC10 *in vivo*.

ES 2 339 333 T3

Los estudios previos han mostrado que las células L540cy inyectadas por vía intravenosa en ratones SCID se extienden de forma comparable a la diseminación de la HD humana y muestran una localización preferencial para los ganglios linfáticos (Kapp *et al.*, 1994, Ann Oncol. 5Suppl 1:121-126). Para evaluar cAC10 en este modelo de HD diseminado, se inyectaron 1×10^7 L540cy células fueron inyectadas a través de la vena caudal en ratones SCID C.B-17. Los ratones no tratados, o los que se trataron con un mAb de control no vinculante, desarrollaron síntomas de la enfermedad diseminada, en particular parálisis de la extremidad posterior, durante los 30-40 días de inyección de células tumorales (Fig. 10A). Los ratones que desarrollaron estos u otros síntomas de la enfermedad se sacrificaron después conforme a las pautas IACUC. La terapia con cAC 10 se inició un día después de la inyección de células tumorales y se administró mediante inyección intraperitoneal cada cuatro días hasta un total de 5 inyecciones. Todos los animales (5/5) que recibieron un régimen de dosificación de 4 mg/kg/inyección, y 4/5 que recibieron o bien 1 mg/kg/inyección o 2 mg/kg/inyección, sobrevivieron durante más de 120 días (la longitud del estudio) sin síntomas de enfermedad.

En un estudio posterior se evaluó la eficacia de cAC10 variando el día en el cual se inició la terapia. Para este estudio se inyectaron células L540cy en los ratones SCID a través de la vena caudal el día 0 y la terapia se inició o bien el día 1, el día 5, o el día 9 (Fig. 10B). En todos los grupos tratados, se administró cAC10 en 4 mg/kg usando una fórmula de q4dx5. Consecuentemente con el estudio anterior cAC10 impactó significativamente en la supervivencia de los animales que recibieron terapia comenzando el día 1, con 4/5 animales sin enfermedad después de 140 días. Cuando el inicio de la terapia se retrasó, cAC10 siguió demostrando una eficacia significante; 3/5 animales que recibieron terapia desde el día 5, y 2/5 que empezaron el día 9, permanecieron sin la enfermedad durante todo el estudio.

cAC 10 también demostró eficacia en los modelos tumorales de la HD de L540cy subcutáneos. A los ratones SCID se les implantaron 2×10^7 células en el flanco. La terapia con cAC10 se inició cuando el tamaño tumoral en cada grupo de 5 animales alcanzó un promedio de 50 mm^3 . El tratamiento consistió en inyecciones intraperitoneales de cAC10 cada 4 días hasta 5 inyecciones usando las mismas dosis que en el modelo diseminado: es decir, 1, 2, y 4 mg/kg/inyección. Los tumores en los animales no tratados crecieron rápidamente y alcanzaron un promedio de $>800 \text{ mm}^3$ en el día 34. El cAC10 produjo un retraso significativo en el crecimiento tumoral en todas las concentraciones evaluadas de una manera dependiente de la dosis (Fig. 10C).

11. Actividad antitumoral del AC10 quimérico producido en una línea celular de hibridoma contra los xenotransplantes subcutáneos de la enfermedad de Hodgkin L540cy

11.1 Materiales y métodos

El AC10 quimérico (cAC 10) se generó mediante recombinación homóloga esencialmente como se describe anteriormente usando vectores de conversión kappa de cadena pesada y ligera de IgG1 humano (Yarnold and Fell, 1994 Cancer Res. 54: 506-512). Estos vectores se diseñaron de manera que los sitios de región constante de inmunoglobulina de murina de cadena pesada y ligera se cortan y se sustituyen por los sitios de región constante gamma 1 y kappa humana mediante recombinación homóloga. La línea celular de hibridoma quimérico resultante expresa un anticuerpo quimérico consistiendo en las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal original y de las regiones constantes gamma 1 y kappa humanas.

11.2 Resultados

Para evaluar la eficacia de cAC10 *in vivo*, se les implantó células L540cy subcutáneamente a los ratones SCID como se ha descrito anteriormente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio mayor de 150 mm^3 se dividió a los ratones en grupos que o bien no se habían tratado o se habían tratado con 2 mg/kg de cAC 10 dos veces por semana hasta un total de cinco inyecciones. Los tumores en los ratones no tratados crecieron rápidamente hasta un tamaño medio mayor de 600 mm^3 (Fig. 11). Por el contrario, el tamaño tumoral medio en los animales tratados con cAC 10 permaneció más o menos igual.

12. Actividad *in vitro* de conjugado de fármaco de AC10 quimérico

Se puede utilizar cAC10 para administrar selectivamente un agente citotóxico a las células positivas de CD30. Como se muestra en la Fig. 12, Karpas positivo de CD30 (ALCL) y L540cy (HD), y la línea de células B negativa de CD30 Daudi se examinaron para averiguar la sensibilidad relativa a un agente citotóxico administrado mediante un conjugado de fármacos del anticuerpo cAC10 (ADC). Las células se expusieron a CAC10 conjugado al agente citotóxico AEB (cAC10-AEB) durante 2 h, se lavaron para eliminar el ADC libre y se determinó la viabilidad celular a las 96 h. La citotoxicidad como se determina por el ensayo de reducción de colorantes de tetrazolio (XTT). Tanto Karpas 299 como L540cy fueron sensibles al conjugado cAC10-AEB con valores de IC_{50} (concentración que mató al 50% de las células) de <0.1 microgramo/ml. Por el contrario, los valores de IC_{50} en las células Daudi fueron >10 microgramo/ml. Las tres líneas celulares fueron igual de sensibles al auristatin E no conjugado por sí mismo (datos no mostrados).

13. Actividad antitumoral de conjugados fármaco-AC10 quimérico

La actividad antitumoral del AC10 quimérico conjugado al AEB derivado de auristatin E (como se describe en la solicitud estadounidense n°. 09/8.45.786 presentada el 30 de abril de 2001, se evaluó en ratones SCID portadores, de

ES 2 339 333 T3

xenotransplantes L540cy de la enfermedad de Hodgkin (Fig. 13). A los ratones se les implantaron subcutáneamente células de L540cy y la terapia se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 75 mm³. La terapia consistió en la administración de cAC10-AEB en o bien 3 mg/kg/dosis o 10 mg/kg/dosis con un total de 4 dosis administradas a intervalos de 4 días (q4dx4). Los tumores en todos los ratones que recibieron cAC10-AEB en ambas dosis se recuperaron completamente y estaban curados el día 18 tras implante tumoral, 9 días después del inicio de la terapia. Estas recuperaciones completas mantuvieron su efecto durante la duración del estudio. Estos resultados demuestran que un anticuerpo anti-CD30 quimérico conjugado a un fármaco quimioterapéutico, tal como auristatin E, puede tener una eficacia significativa en la enfermedad de Hodgkin.

10

Documentos citados en la descripción

Esta lista de documentos citados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

15

Documentos de patente citados en la descripción

- | | | |
|----|-------------------------------------|------------------------------|
| 20 | - WO 9622384 A [0018] | - US 5427908 A [0070] |
| | - US 5888809 A [0044] [0228] | - US 5750753 A [0070] |
| | - US 84578601 A, 2001 [0044] | - US 5821047 A [0070] |
| 25 | [0153] [0246] | - US 5571698 A [0070] |
| | - US 5939598 A, Kucherlapati [0056] | - US 5516637 A [0070] |
| | - WO 9317715 A [0057] | - US 5780225 A [0070] |
| 30 | - WO 9208802 A [0057] | - US 5658727 A [0070] |
| | - WO 9100360 A [0057] | - US 5733743 A [0070] |
| 35 | - WO 9205793 A [0057] | - US 5969108 A [0070] |
| | - US 4474893 A [0057] | - WO 9222324 A [0071] |
| | - US 4714681 A [0057] | - US 4946778 A [0072] [0123] |
| 40 | - US 4925648 A [0057] | - US 5258498 A [0072] |
| | - US 5573920 A [0057] | - US 5807715 A [0072] |
| 45 | - US 5601819 A [0057] | - US 4816567 A [0072] |
| | - GB9101134W [0070] | - US 4816397 A [0072] |
| | - WO 9002809 A [0070] | - US 5585089 A, Queen [0073] |
| 50 | - WO 9110737 A [0070] | [0074] |
| | - WO 9201047 A [0070] [0076] | - EP 239400 A [0074] |
| 55 | - WO 9218619 A [0070] | - WO 9109967 A [0074] |
| | - WO 9311236 A [0070] | - US 5225539 A [0074] |
| | - WO 9515982 A [0070] | - US 5530101 A [0074] |
| 60 | - WO 9520401 A [0070] | - EP 592106 A [0074] |
| | - US 5698426 A [0070] | - EP 519596 A [0074] |
| 65 | - US 5223409 A [0070] | - US 5565332 A [0074] |
| | - US 5403484 A [0070] | - US 4444887 A [0075] |

ES 2 339 333 T3

- US 5580717 A [0070]
- WO 9846645 A [0075]
5 - WO 9850433 A [0075]
- WO 9824893 A [0075] [0076]
- WO 9816654 A [0075]
10 - WO 9634096 A [0075] [0076]
- WO 9633735 A [0075] [0076]
15 - WO 9110741 A [0075]
- EP 0598877 A [0076]
- US 5413923 A [0076]
20 - US 5625126 A [0076]
- US 5633425 A [0076]
25 - US 5569825 A [0076]
- US 5661016 A [0076]
- US 5545806 A [0076]
30 - US 5814318 A [0076]
- US 5885793 A [0076]
35 - US 5916771 A [0076]
- WO 9208495 A [0080]
- WO 9114438 A [0080]
40 - WO 8912624 A [0080]
- US 5314995 A [0080]
45 - EP 396387 A [0080]
- US 4716111 A [0075]
- WO 8605807 A [0133]
- WO 8901036 A [0133]
- US 5122464 A [0133]
- US 5336603 A [0146]
- US 5622929 A [0146]
- US 5359046 A [0146]
- US 5349053 A [0146]
- US 5447851 A [0146]
- US 5112946 A [0146]
- EP 307434 A [0146]
- EP 367166 A [0146]
- WO 9604388 A [0146]
- WO 9106570 A [0146]
- US 4676980 A, Segal [0156]
- US 4980286 A [0162] [0180]
- WO 9206180 A [0162]
- WO 9222635 A [0162]
- WO 9220316 A [0162]
- WO 9314188 A [0162]
- WO 9320221 A [0162]
- WO 9408598 A [0169]

Bibliografía fuera de la patente citada en la descripción

- **Engert et al.** *Seminars in Hematology*, 1999, vol. 36, 282-289 [0002]
50 - **Froese et al.** *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 2081-87 [0004]
- **Dürkop et al.** *Cell*, 1992, vol. 88, 421-427 [0005]
55 - **Schwab et al.** *Nature*, 1982, vol. 299, 65-67 [0005] [0007]
- **Josimovic-Alasevic et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1989, vol. 19, 157-162 [0005]
- **Engert et al.** *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 84-88 [0005] [0017]
60 - **Barth et al.** *Blood*, 2000, vol. 95, 3909-3914 [0005] [0009]
- **Falini et al.** *British Journal of Haematology*, 1992, vol. 82, 38-45 [0005] [0008] [0016]
65 - **Falini et al.** *Lancet*, 1992, vol. 339, 1195-1196 [0005] [0009] [0009]
- **Tsutsumi et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, vol. 97, 8545-8553 [0006] [0006]

ES 2 339 333 T3

- **Schwarting et al. Blood**, 1989, vol. 74, 1678-1689 [0007]
- Leukocyte Typing III Oxford University Press 1987. [0007]
- 5 - **Renner et al. Cancer Immunol. Immunother.**, 2000, vol. 49, 173-180 [0009]
- **Horn-Lohrens et al. Int. J. Cancer**, 1995, vol. 60, 539-544 [0009]
- **Gruss et al. Blood**, 1994, vol. 83, 2045-2056 [0010] [0010] [0012] [0016] [0016] [0016] [0020] [0233] [0233]
- 10 - **Hubinger et al. Oncogene**, 2001, vol. 20, 590-598 [0012] [0235]
- **Tian et al. Cancer Research**, 1995, vol. 55, 5335-5341 [0012] [0014]
- **Bowen et al. J. Immunol.**, 1993, vol. 151, 5896-5906 [0013] [0013] [0230]
- 15 - **Hecht et al. J. Immunol.**, 1985, vol. 134, 4231-4236 [0014]
- **Tutt et al. J. Immunol.**, 1998, vol. 161, 3176-3185 [0015]
- **Tian et al. Cancer Res.**, 1995, vol. 55, 5335-5341 [0016] [0233]
- 20 - **Hansen et al. Immunobiol.**, 1991, vol. 183, 214- [0017]
- **Press et al. J. Immunol.**, 1988, vol. 141, 4410-4417 [0017]
- **May et al. J. Immunol.**, 1990, vol. 144, 3637-3642 [0017]
- **Schwarting et al. Blood**, 1988, vol. 74, 1678-1689 [0019]
- 30 - **G. Pallesen Histopathology**, 1990, vol. 16, 409-413 [0019]
- **Donaldson et al. J. Immunol. Meth.**, 1997, vol. 203, 25-33 [0044] [0111] [0226] [0226] [0236]
- **Tutt et al. J. Immunol.**, 1991, vol. 147, 60-69 [0057]
- **Kostelny et al. J. Immunol.**, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0057]
- 40 - **Harlow et al. Antibodies: A Laboratory Manual** Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988. [0066]
- **Hammerling et al. Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas** Elsevier 1981. 563-681 [0066]
- **Brinkman et al. J. Immunol. Methods**, 1995, vol. 182, 41-50 [0070]
- 45 - **Ames et al. J. Immunol. Methods**, 1995, vol. 184, 177-186 [0070]
- **Kettleborough et al. Eur. J. Immunol.**, 1994, vol. 24, 952-958 [0070]
- **Persic et al. Gene**, 1997, vol. 187, 9-18 [0070]
- 50 - **Burton et al. Advances in Immunology**, 1994, 191-280 [0070]
- **Mullinax et al. BioTechniques**, 1992, vol. 12, no. 6. 864-869 [0071]
- **Sawai et al. AJRI**, 1995, vol. 34, 26-34 [0071]
- 55 - **Better et al. Science**, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0071]
- **Huston et al. Methods in Enzymology**, 1991, vol. 203, 46-88 [0072]
- 60 - **Shu et al. PNAS**, 1993, vol. 90, 7995-7999 [0072]
- **Skerra et al. Science**, 1988, vol. 240, 1038-1040 [0072]
- 65 - **Morrison Science**, 1985, vol. 229, 1202- [0072]
- **Oi et al. BioTechniques**, 1986, vol. 4, 214- [0072]

ES 2 339 333 T3

- **Gillies et al.** *J. Immunol. Methods*, 1989, vol. 125, 191-202 [0072]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323- [0073]
- 5 - **Padlan** *Molecular Immunology*, 1991, vol. 28, no. 4, 5. 489-498 [0074]
- **Studnicka et al.** *Protein Engineering*, 1994, vol. 7, no. 6. 805-814 [0074]
- **Roguska et al.** *PNAS*, 1994, vol. 91, 969-973 [0074]
- 10 - **Lonberg Huszar** *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0076]
- **Jespers et al.** *Bio/technology*, 1994, vol. 12, 899-903 [0077]
- 15 - **Greenspan Bona** *FASEB J.*, 1989, vol. 7, no. 5. 437-444 [0078]
- **Nissinoff** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, no. 8. 2429-2438 [0078]
- **Blanar Rutter** *Science*, 1992, vol. 256, 1014-1018 [0082] [0082]
- 20 - **Edery et al.** *Gene*, 1988, vol. 74, 517-525 [0082]
- **Chien et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0083]
- 25 - **C. Vinson et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 911-916 [0089]
- **Landschultz et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1759-1764 [0090]
- **Baxevanis Vinson** *Curr. Op. Gen. Devel.*, 1993, vol. 3, 278-285 [0090]
- 30 - **O'Shea et al.** *Science*, 1989, vol. 243, 538-542 [0090]
- **Murre et al.** *Cell*, 1989, vol. 56, 777-783 [0091]
- 35 - **Davis et al.** *Cell*, 1990, vol. 60, 733-746 [0091]
- **Voronova Baltimore** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 4722-4726 [0091]
- **Bohmann et al.** *Science*, 1987, vol. 238, 1386-1392 [0092]
- 40 - **Hai et al.** *Genes Dev.*, 1989, vol. 3, 2083-2090 [0092]
- **Cao et al.** *Genes Dev.*, 1991, vol. 5, 1538-1552 [0092]
- 45 - **Williams et al.** *Genes Dev.*, 1991, vol. 5, 1553-1567 [0092]
- **Roman et al.** *Genes Dev.*, 1990, vol. 4, 1404-1415 [0092]
- **Hai Curran** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 3720-3724 [0092]
- 50 - Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. 1994. vol. 1, [0094]
- Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. 1994. vol. 1, 10.16.1- [0095]
- 55 - Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. 1994. vol. 1, 10.8.1- [0096]
- Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.1994. vol. 1, 11.2.1- [0097]
- **Page et al.** *Intl. J. of Oncology*, 1993, vol. 3, 473-476 [0105]
- 60 - **Skehan et al.** *J. Nat'l Cancer Inst.*, 1990, vol. 82, 1107-12 [0106]
- **Mosmann** *J. Immunol. Methods*, 1983, vol. 65, 55-63 [0107]
- 65 - **Piazza et al.** *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 3110-16 [0108]
- *Biochemica*, 1999, 34-37 [0109]

ES 2 339 333 T3

- **Duke Cohen** *et al. Current Protocols In Immunology* 1992, 3.17.1-3.17.16 [0110]
- **Shilo Weinberg** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, vol. 78, 6789-6792 [0114]
- 5 - **Sambrook** *et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. [0117]
- *Current Protocols in Molecular Biology* series of laboratory technique manuals 1987. [0117]
- *Current Protocols* John Wiley and Sons, Inc. 1994. [0117]
- 10 - **Kutmeier** *et al. BioTechniques*, 1994, vol. 17, 242- [0118]
- **Sambrook** *et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory 1990. [0120]
- 15 - *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons 1998. [0120]
- **Chothia** *et al. J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 278, 457-479 [0121]
- **Morrison** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 851-855 [0122]
- 20 - **Neuberger** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0122]
- **Takeda** *et al. Nature*, 1985, vol. 314, 452-454 [0122]
- 25 - **Bird** *Science*, 1988, vol. 242, 423-42 [0123]
- **Huston** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0123]
- **Ward** *et al. Nature*, 1989, vol. 334, 544-54 [0123]
- 30 - **Skerra** *et al. Science*, 1988, vol. 242, 1038-1041 [0123]
- **Karlin Altschul** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 2264-2268 [0129]
- 35 - **Karlin Altschul** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0129]
- **Altschul** *et al. J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0129]
- **Altschul** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0129]
- 40 - **Myers Miller** *CABIOS*, 1989, [0129]
- **Torellis Robotti** *Comput. Appl. Biosci.*, 1994, vol. 10, 3-5 [0129]
- 45 - **Pearson Lipman** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 2444-8 [0129]
- **Higgins** *et al. Methods Enzymol.*, 1996, vol. 266, 383-402 [0130]
- **Foecking** *et al. Gene*, 1986, vol. 45, 101- [0135]
- 50 - **Cockett** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 2- [0135]
- **Ruther** *et al. EMBO J.*, 1983, vol. 2, 1791- [0136]
- 55 - **Inouye Inouye** *Nucleic Acids Res.*, 1985, vol. 13, 3101-3109 [0136]
- **Van Heeke Schuster** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 24, 5503-5509 [0136]
- **Logan Shenk** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 8 1, 355-359 [0138]
- 60 - **Bittner** *et al. Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 153, 51-544 [0138]
- **Wigler** *et al. Cell*, 1977, vol. 11, 223- [0141]
- 65 - **Szybalska Szybalski** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 48, 202- [0141]
- **Lowy** *et al. Cell*, 1980, vol. 22, 8-17 [0141]

ES 2 339 333 T3

- **Wigler et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980**, vol. 77, 357- [0141]
- **O'Hare et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981**, vol. 78, 1527- [0141]
- 5 - **Mulligan Berg Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981**, vol. 78, 2072- [0141]
- *Clinical Pharmacy*, vol. 12, 488-505 [0141]
- **Wu Wu Biotherapy, 1991**, vol. 3, 87-95 [0141] [0159]
- 10 - **Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1993**, vol. 32, 573-596 [0141] [0159]
- **Mulligan Science, 1993**, vol. 260, 926-932 [0141] [0159]
- 15 - **Morgan Anderson Ann. Rev. Biochem., 1993**, vol. 62, 191-217 [0141] [0159]
- *TIB TECH, 1993*, vol. 11, no. 5. 155-215 [0141]
- **Santerre et al. Gene, 1984**, vol. 30, 147- [0141]
- 20 - Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons1993. [0141] [0159]
- **Kriegler Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual Stockton Press1990.** [0141]
- 25 - Current Protocols in Human Genetics John Wiley & Sons1994. [0141]
- **Colberre-Garapin et al. J. Mol. Biol., 1981**, vol. 150, 1- [0141]
- **Bebbington Hentschel The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in**
30 **Mammalian Cells in DNY Cloning Academic Press1987.** vol. 3, [0142]
- **Crouse et al. Mol. Cell. Biol., 1983**, vol. 3, 257- [0142]
- **Proudfoot Nature, 1986**, vol. 322, 52- [0143]
- 35 - **Kohler Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980**, vol. 72, no. 2. 197- [0143]
- **Ashkenazi et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1991**, vol. 88, 10535-10539 [0146]
- 40 - **Zheng et al. J. Immunol., 1995**, vol. 154, 5590-5600 [0146]
- **Vil et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992**, vol. 89, 11337-11341 [0146]
- **Gentz et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989**, vol. 86, 821-824 [0150]
- 45 - **Wilson et al. Cell, 1984**, vol. 37, 767- [0150]
- **Endo et al. Cancer Research, 1987**, vol. 47, 1076-1080 [0152]
- 50 - **Gallego et al. Int. J. Cancer., 1984**, vol. 33, 737-744 [0152]
- **Ohkawa et al. Cancer Immunol. Immunother., 1986**, vol. 23, 81-86 [0152]
- **Rowland et al. Cancer Immunol Immunother., 1986**, vol. 21, 183-187 [0152]
- 55 - Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy **Arnon et al. Monoclonal Antibodies**
And Cancer Therapy Alan R. Liss, Inc. 1985. 243-56 [0155]
- Antibodies For Drug Delivery **Hellstrom et al. Controlled Drug Delivery Marcel Dekker, Inc. 1987.** 623-53
60 [0155]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review Thorpe *et al. Monoclonal Antibodies '84:*
Biological And Clinical Applications 1985. 475-506 [0155]
- 65 - Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy
Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy Academic Press1985. 303-16 [0155]
- **Thorpe et al. Immunol. Rev., 1982**, vol. 62, 119-58 [0155]

ES 2 339 333 T3

- **Goldspiel et al.** *Clinical Pharmacy*, 1993, vol. 12, 488-505 [0159]
- *TIBTECH 1*, 1993, vol. 1, no. 5. 155-215 [0159]
- 5 - Gene Transfer and Expression **Kriegler** A Laboratory Manual Stockton Press 1990. [0159]
- **Koller Smithies** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8932-8935 [0160] [0162]
- **Zijlstra et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 435-438 [0160] [0162]
- 10 - **Wu Wu** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0162] [0175]
- **Miller et al.** *Meth. Enzymol.*, 1993, vol. 217, 581-599 [0163]
- 15 - **Boesen et al.** *Biotherapy*, 1994, vol. 6, 29 1-302 [0163]
- **Clowes et al.** *J. Clin. Invest.*, 1994, vol. 93, 644-651 [0163]
- **Klein et al.** *Blood*, 1994, vol. 83, 1467-1473 [0163]
- 20 - **Salmons Gunzberg** *Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 129-141 [0163]
- **Grossman Wilson** *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 1993, vol. 3, 110-114 [0163]
- 25 - **Loeffler Behr** *Meth. Enzymol.*, 1993, vol. 217, 599-618 [0165]
- **Cohen et al.** *Meth. Enzymol.*, 1993, vol. 217, 618-644 [0165]
- **Cline** *Pharmac. Ther.*, 1985, vol. 29, 69-92 [0165]
- 30 - **Stemple Anderson** *Cell*, 1992, vol. 71, 973-985 [0169]
- **Rheinwald** *Meth. Cell Bio.*, 1980, vol. 21 A, 229- [0169]
- 35 - **Pittelkow Scott** *Mayo Clinic Proc.*, 1986, vol. 61, 771- [0169]
- **Langer** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0177] [0179]
- **Treat et al.** *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer* Liss 1989. 353-365 [0177]
- 40 - **Lopez-Berestein** LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER 317-327 [0177]
- **Sefton** *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 1989, vol. 14, 201- [0178]
- 45 - **Buchwald et al.** *Surgery*, 1980, vol. 88, 507- [0178]
- **Saudek et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1989, vol. 321, 574- [0178]
- 50 - *Medical Applications of Controlled Release* CRC Pres. 1974. [0178]
- *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* Wiley 1984. [0178]
- **Ranger Peppas** *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 1983, vol. 23, 61- [0178]
- 55 - **Levy et al.** *Science*, 1985, vol. 228, 190- [0178]
- **During et al.** *Ann. Neurol.*, 1989, vol. 25, 351- [0178]
- 60 - **Howard et al.** *J. Neurosurg.*, 1989, vol. 71, 105- [0178]
- **Joliot et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1864-1868 [0180]
- **Bowen** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 5896-5906 [0206]
- 65 - **Gruss et al.** *Blood*, 1996, vol. 83, 2045-2056 [0210]
- **Gruss et al.** *Blood*, vol. 83, no. 8. 2045-2056 [0213]

ES 2 339 333 T3

- **Hubinger et al.** *Exp. Hematol.*, 1999, vol. 27, no. 12. 1796-805 [0214]

- **Gilliland et al.** *Tissue Antigens*, 1996, vol. 47, 1-20 [0228]

5 - **Donaldson et al.** *J. Immunol: Meth.*, 1997, vol. 203, 25-33 [0235]

- **Mir et al.** *Blood*, 2000, vol. 96, 4307-43 12 [0236]

10 - **Kapp et al.** *Ann Oncol.*, 1994, vol. 5, no. 1. 121-126 [0239] [0240]

- **Yarnold Fell** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 506-512 [0243]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 339 333 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que (i) se enlaza inmunoespecíficamente con CD30 y (ii) por sí mismo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, donde dicho anticuerpo ejerce el efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de una conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente, para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.
- 10 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, siendo el anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
- 10 3. El anticuerpo según la reivindicación 2, donde el anticuerpo compite para unirse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10.
- 15 4. El anticuerpo según la reivindicación 2, donde el anticuerpo compite para unirse con CD30 con el anticuerpo monoclonal HeFi-1.
- 20 5. El anticuerpo según la reivindicación 3, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:4, la SEC ID n°:6, y la SEC ID n°:8, y comprende una región variable de cadena ligera comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 12, la SEC ID n°:14 y la SEC ID n°:16.
- 25 6. El anticuerpo según la reivindicación 3, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°:2, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°:10.
- 30 7. El anticuerpo según la reivindicación 6, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera comprendiendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 2 y la SEC ID n°: 10, respectivamente.
- 35 8. El anticuerpo según la reivindicación 4, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:20, la SEC ID n°:22, y la SEC ID n°:24, y comprende una región variable de cadena ligera comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:28, la SEC ID n°:30 y la SEC ID n°:32.
- 40 9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.
- 40 10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el efecto citostático o citotóxico se exhibe al emplear un método comprendiendo:
- 45 a) poner en contacto un cultivo de la línea celular de la enfermedad de Hodgkin con el anticuerpo, siendo dicho cultivo de aproximadamente 5.000 células en un área de cultivo de aproximadamente 0,33 cm², dicho contacto teniendo una duración de 72 horas;
- 50 b) exponer el cultivo a 0,5 μ Ci de ³H-timidina durante las 8 horas finales de dicho periodo de 72 horas; y
- 50 c) medir la incorporación de ³H-timidina en las células del cultivo, donde el anticuerpo tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular de la enfermedad de Hodgkin cultivada bajo las mismas condiciones pero no habiendo estado en contacto con el anticuerpo.
- 55 11. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin comprendiendo:
- 55 a) un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico que (i) se enlaza inmunoespecíficamente con CD30, (ii) ejerce por sí mismo un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de una conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente, en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin; y
- 60 b) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 65 12. La composición según la reivindicación farmacéutica 11, donde el anticuerpo compite para unirse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10.
13. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, donde el anticuerpo compite para unirse con CD30 con el anticuerpo monoclonal HeFi-1.

ES 2 339 333 T3

14. La composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:4, la SEC ID n°:6, y la SEC ID n°:8, y comprende una región variable de cadena ligera comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:12, la SEC ID n°: 14 y la SEC ID n°:16.

15. La composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°:2, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°:10.

16. La composición farmacéutica según la reivindicación 15, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera comprendiendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:2 y la SEC ID n°:10, respectivamente.

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:20, la SEC ID n°:22, y la SEC ID n°:24, y comprende una región variable de cadena ligera comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:28, la SEC ID n°:30 y la SEC ID n°:32.

18. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en la cual el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

19. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, donde el efecto citostático o citotóxico se exhibe al realizar un método comprendiendo:

- a) poner en contacto un cultivo de la línea celular de la enfermedad de Hodgkin con el anticuerpo, siendo dicho cultivo de aproximadamente 5.000 células en un área de cultivo de aproximadamente 0,33 cm², dicho contacto teniendo una duración de 72 horas;
- b) exponer el cultivo a 0,5 μ Ci de ³H-timidina durante las 8 horas finales de dicho periodo de 72 horas; y
- c) medir la incorporación de ³H-timidina en las células del cultivo, donde el anticuerpo tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular de la enfermedad de Hodgkin cultivadas bajo las mismas condiciones pero no habiendo estado en contacto con el anticuerpo.

20. Uso de un anticuerpo que (i) se enlaza inmunoespecíficamente a CD30 y (ii) por sí mismo ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular de la enfermedad de Hodgkin, donde dicho anticuerpo ejerce el efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de una conjugación a un agente citostático o citotóxico, respectivamente, en la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

21. El uso según la reivindicación 20, siendo el anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

22. El uso según la reivindicación 21, donde el anticuerpo compite para unirse con CD30 con el anticuerpo monoclonal AC10.

23. El uso según la reivindicación 21, donde el anticuerpo compite para unirse con CD30 con el anticuerpo monoclonal HeFi-1.

24. El uso según la reivindicación 22, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:4, la SEC ID n°:6, y la SEC ID n°:8, y comprende una región variable de cadena ligera comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:12, la SEC ID n°:14 y la SEC ID n°:16.

25. El uso según la reivindicación 22, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°:2, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°:10.

26. El uso según la reivindicación 25, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera comprendiendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 2 y la SEC ID n°: 10, respectivamente.

ES 2 339 333 T3

27. El uso según la reivindicación 23, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:20, la SEC ID n°:22, y la SEC ID n°:24, y comprende una región variable de cadena ligera comprendiendo regiones de determinación complementarias teniendo las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°:28, la SEC ID n°:30 y la SEC ID n°:32.

28. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

29. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, donde el efecto citostático o citotóxico se expone al emplear un método comprendiendo:

- a) poner en contacto un cultivo de la línea celular de la enfermedad de Hodgkin con el anticuerpo, siendo dicho cultivo de aproximadamente 5.000 células en un área de cultivo de aproximadamente 0,33 cm², dicho contacto teniendo una duración de 72 horas;
- b) exponer el cultivo a 0,5 μ Ci de ³H-timidina durante las 8 horas finales de dicho periodo de 72 horas; y
- c) medir la incorporación de ³H-timidina en las células del cultivo, donde el anticuerpo tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular de la enfermedad de Hodgkin si las células del cultivo han reducido la incorporación de ³H-timidina en comparación con las células de la misma línea celular de la enfermedad de Hodgkin cultivadas bajo las mismas condiciones pero no habiendo estado en contacto con el anticuerpo.

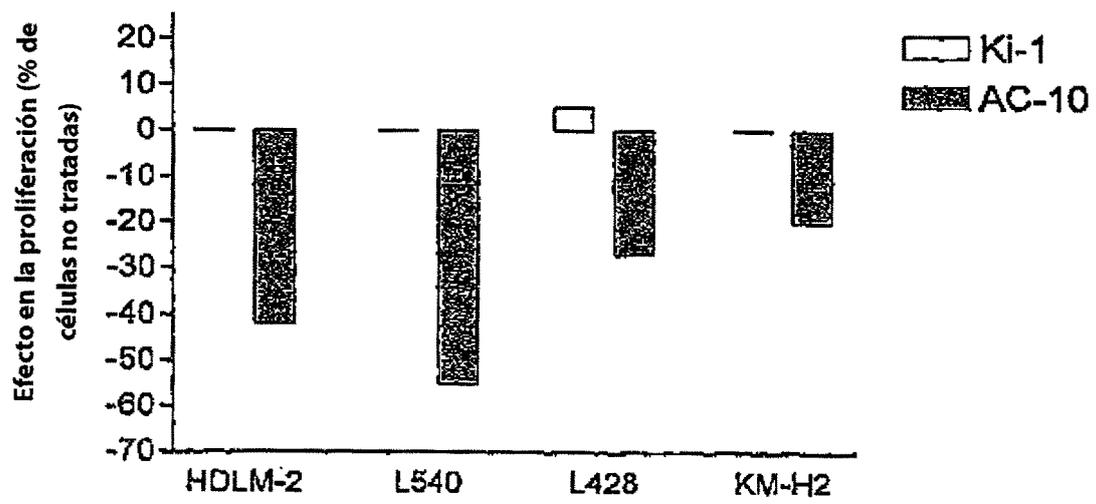


FIG. 1

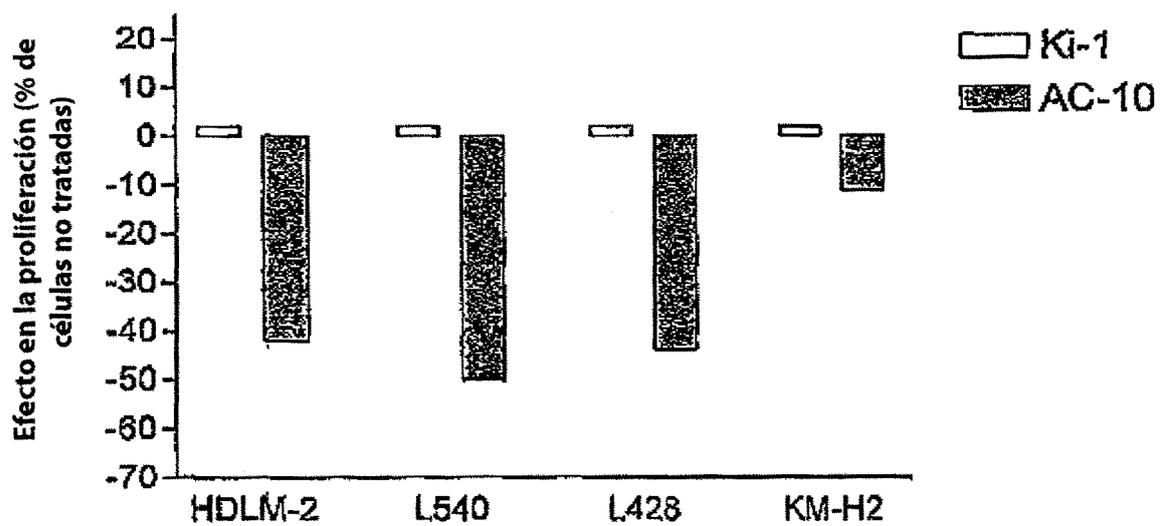


FIG. 2

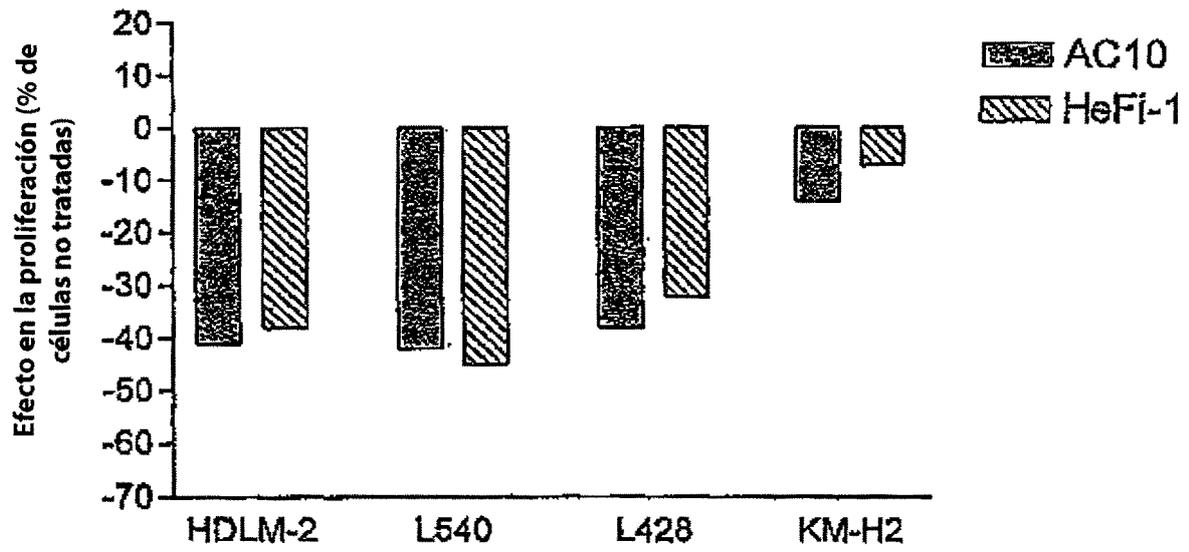


FIG. 3

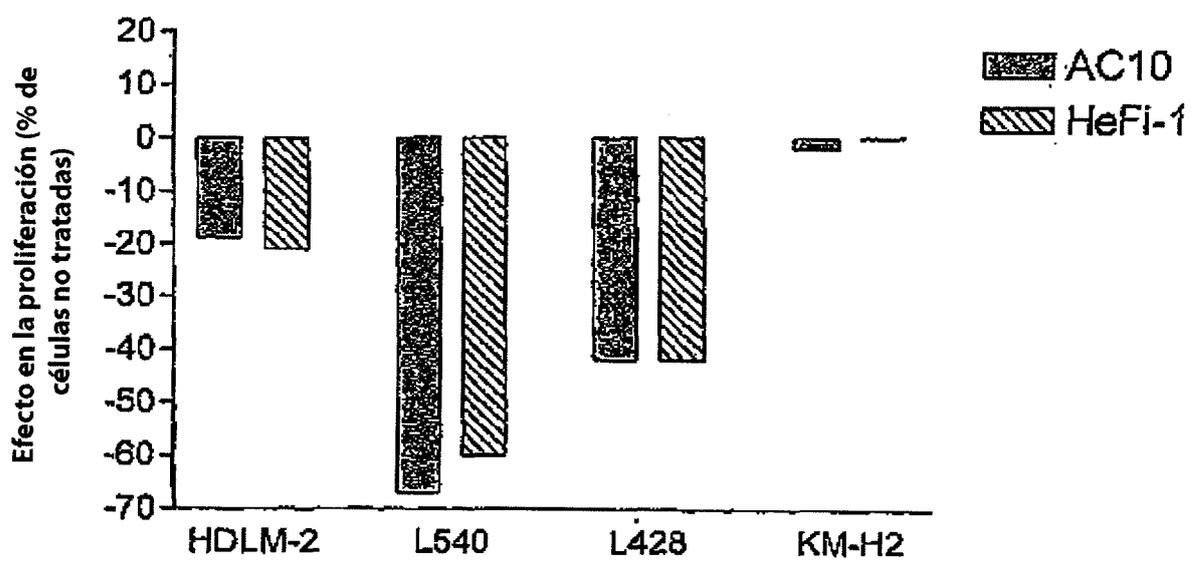


FIG. 4

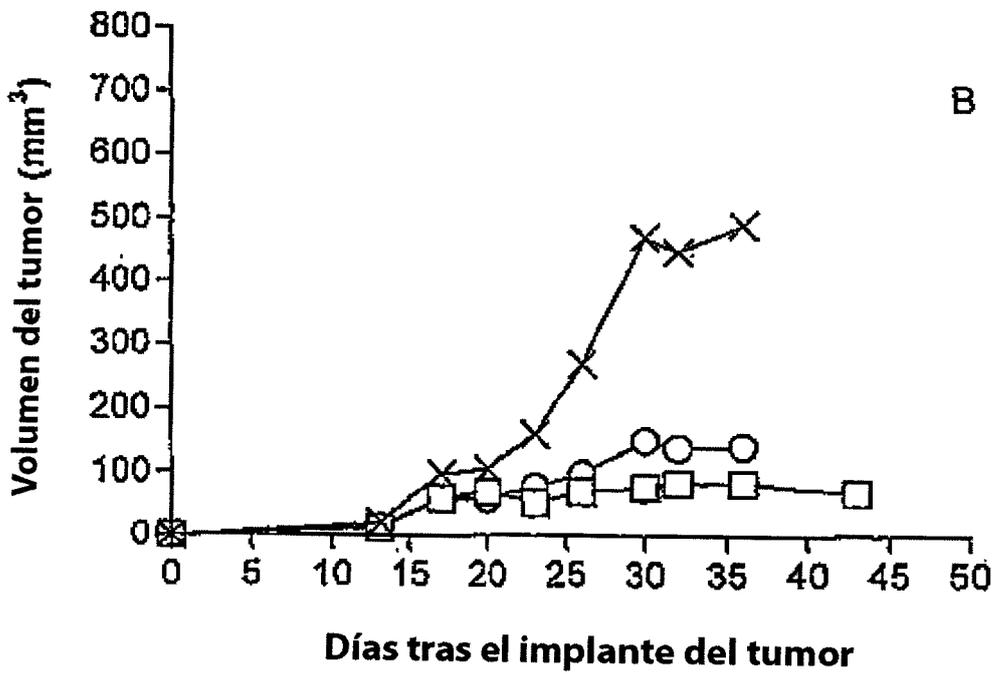
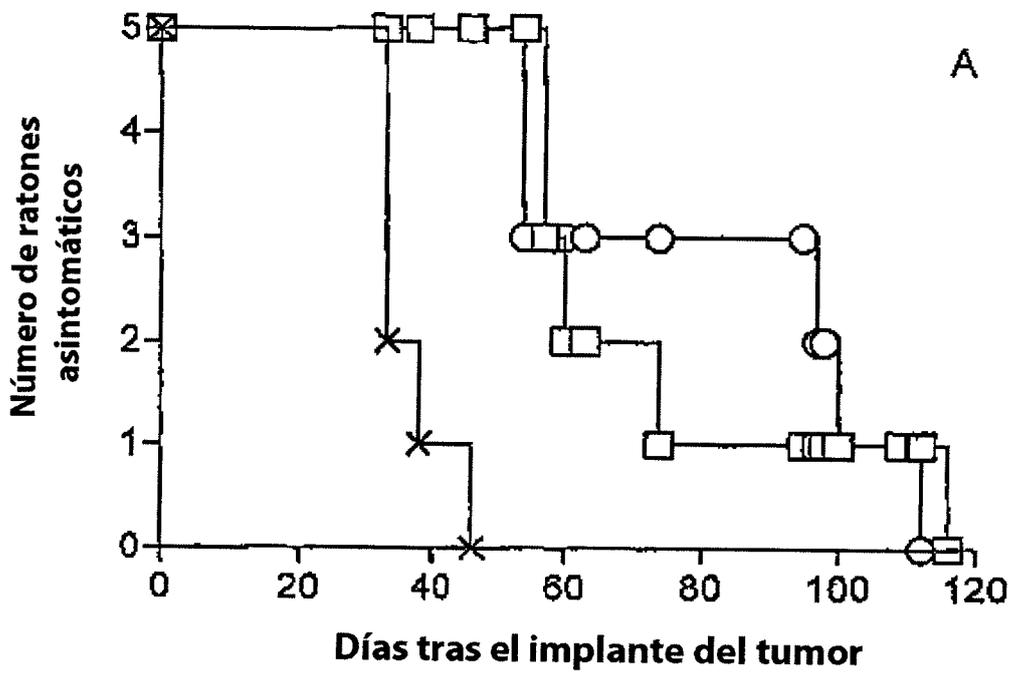
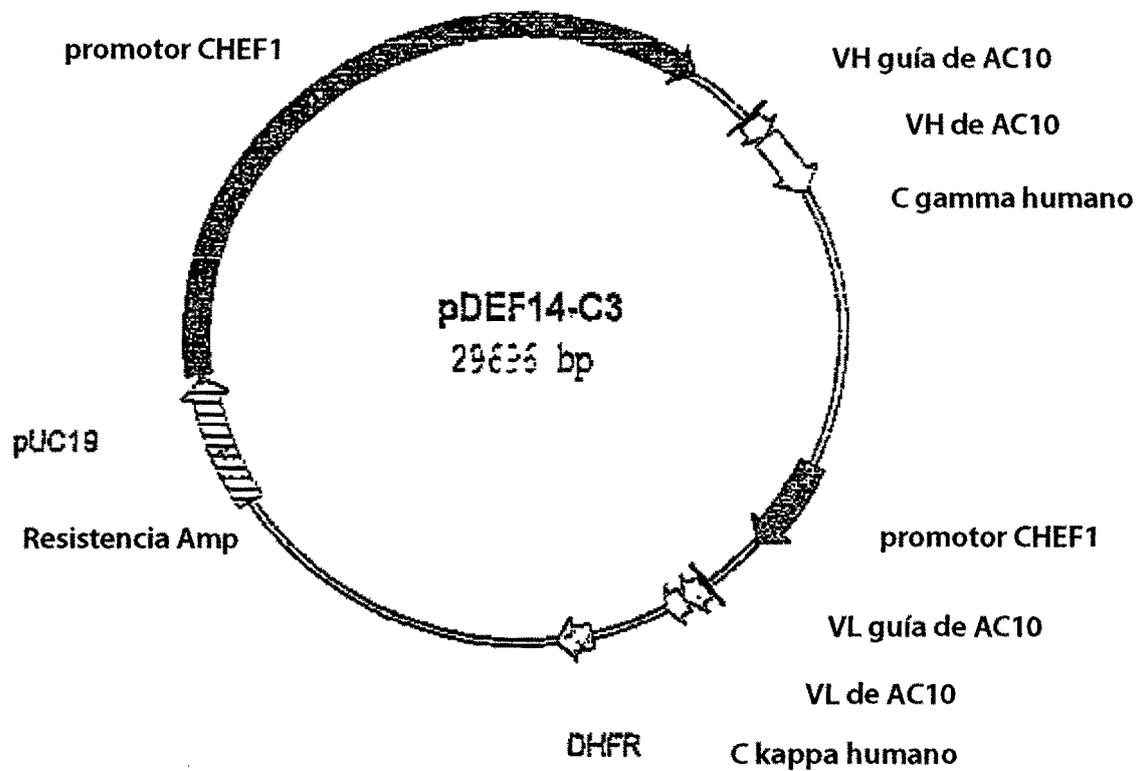


FIG. 5



VECTOR DE EXPRESIÓN cAC10

FIG. 6

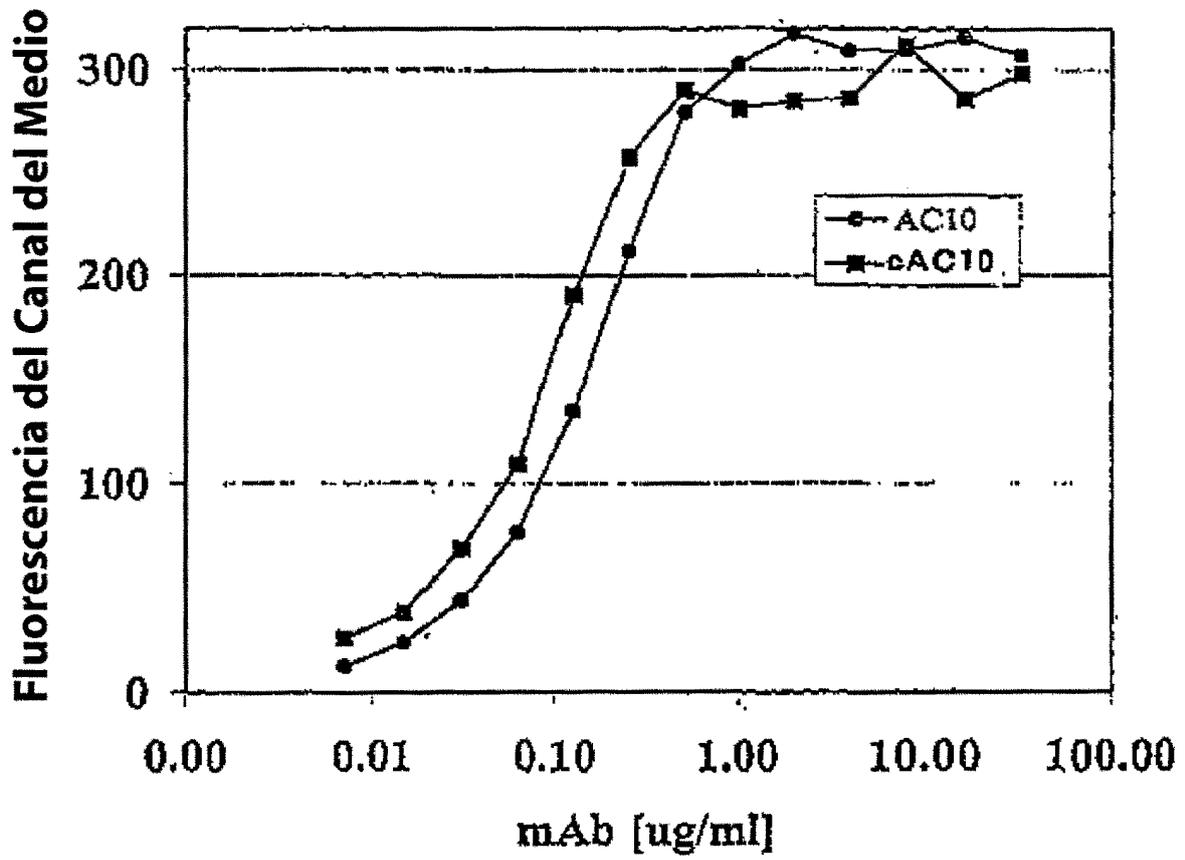


FIG. 7

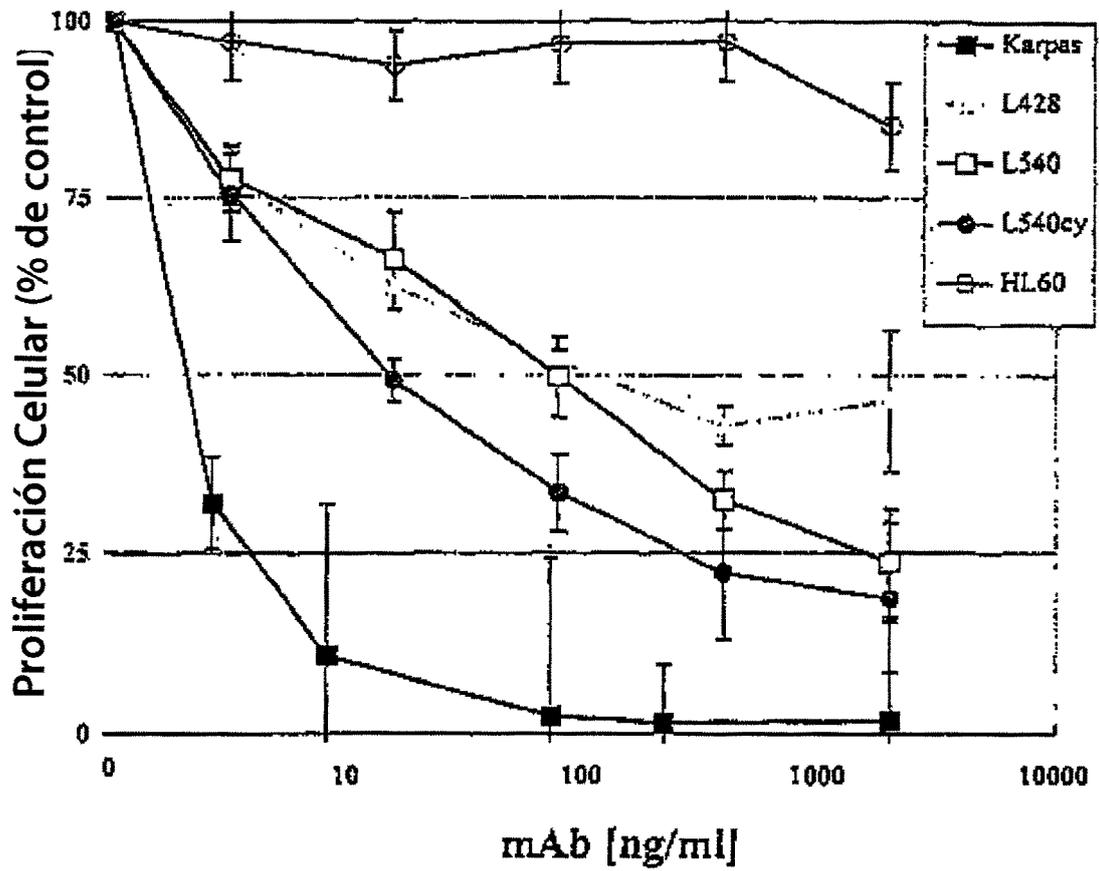


FIG. 8

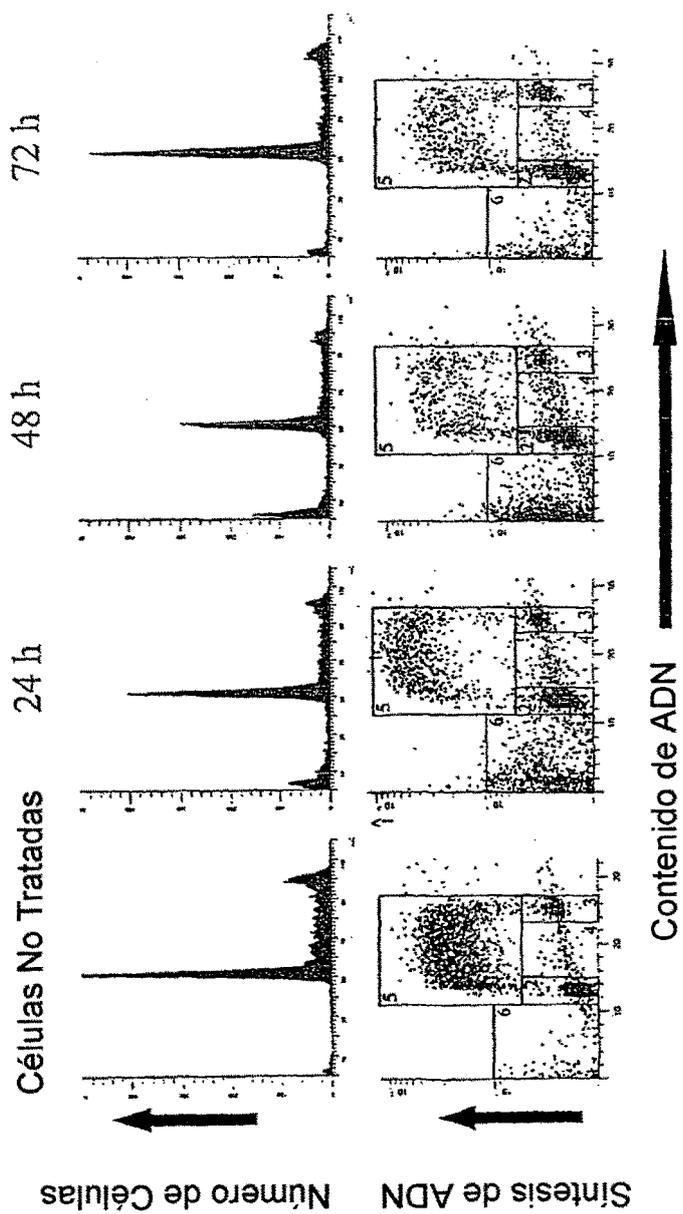


FIG. 9

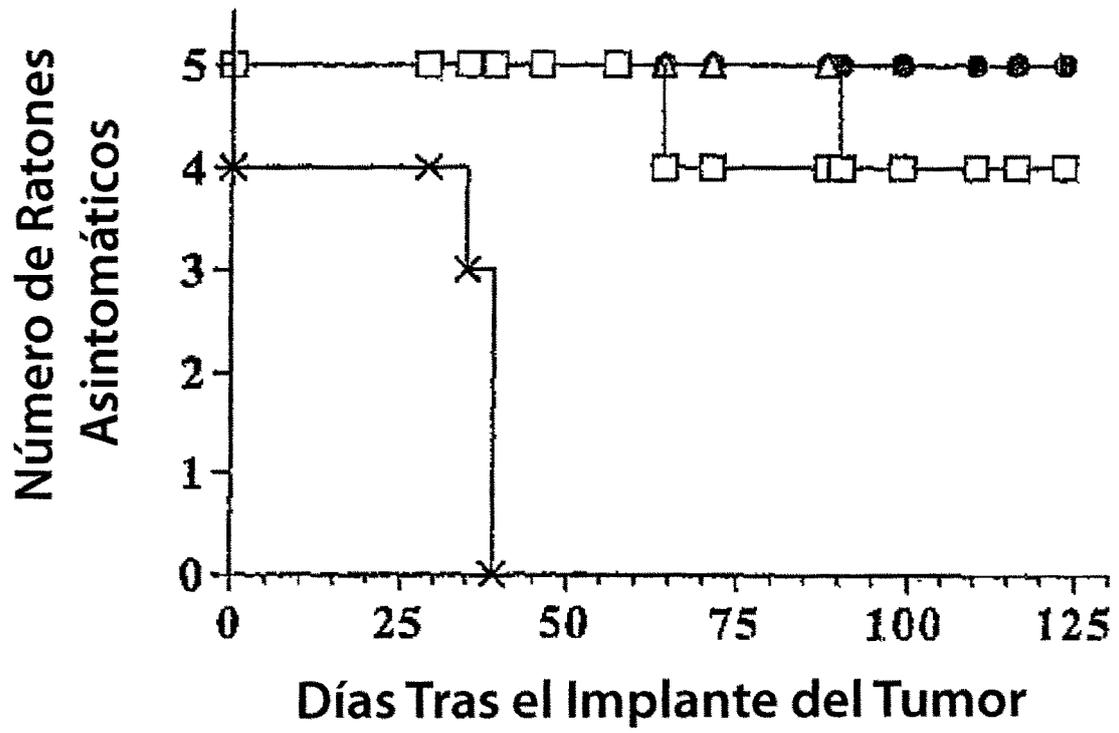


FIG. 10a

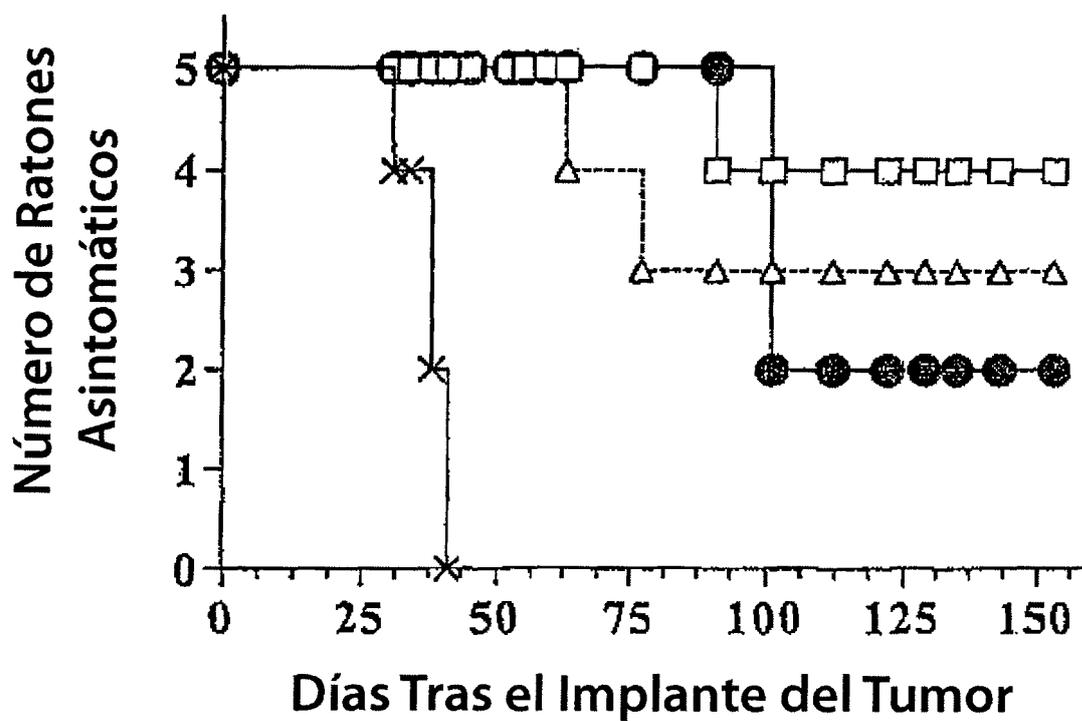


FIG. 10b

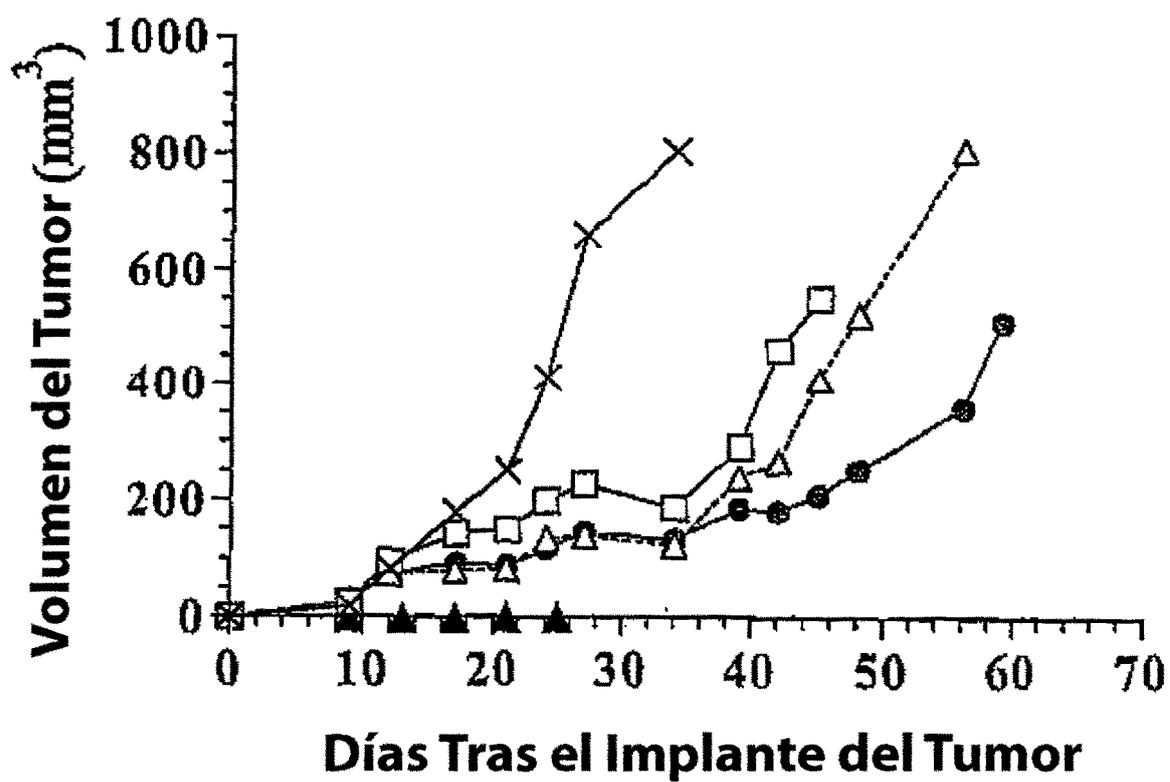


FIG. 10c

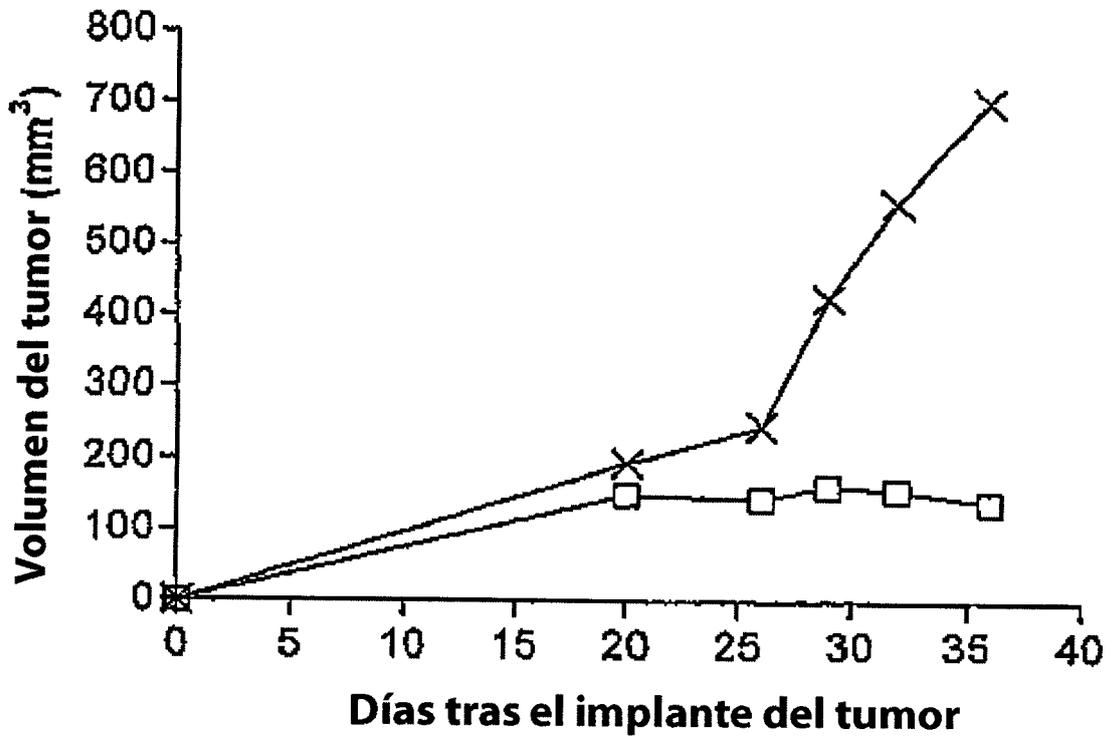


FIG. 11

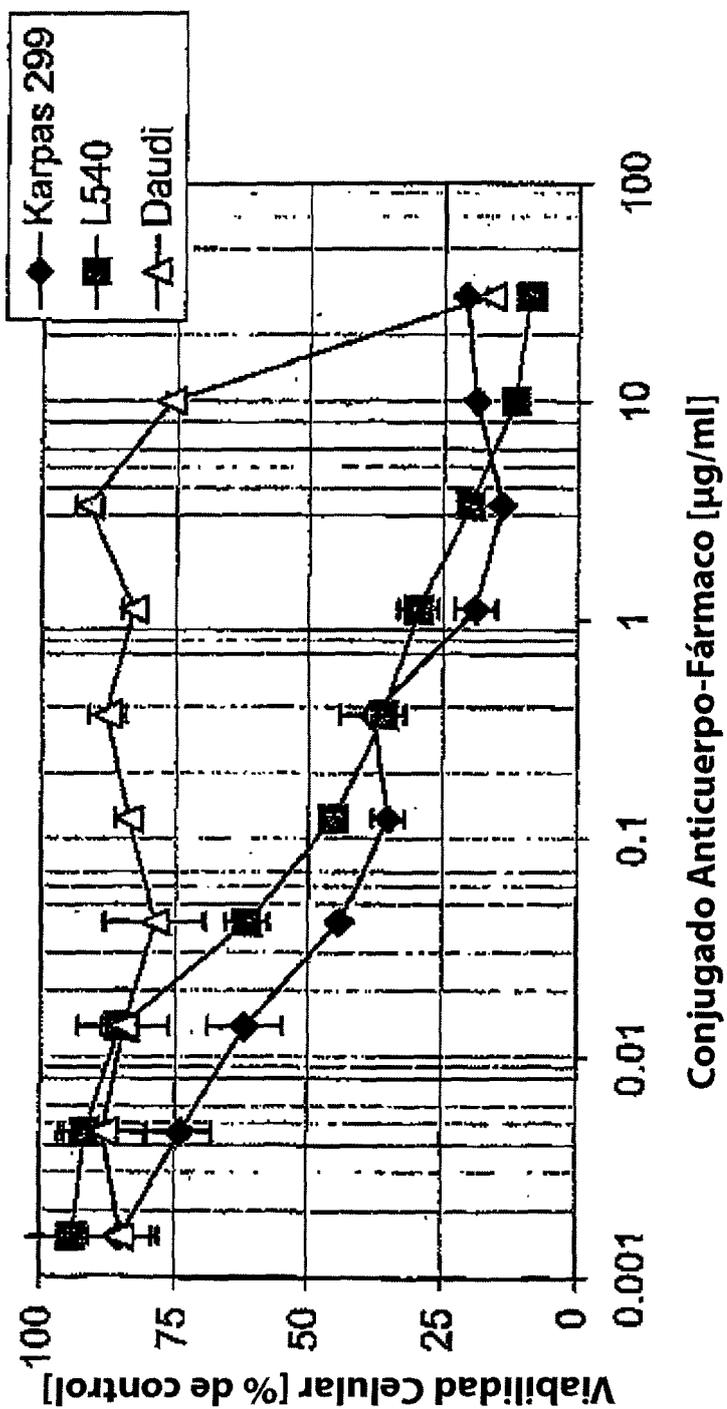


FIG. 12

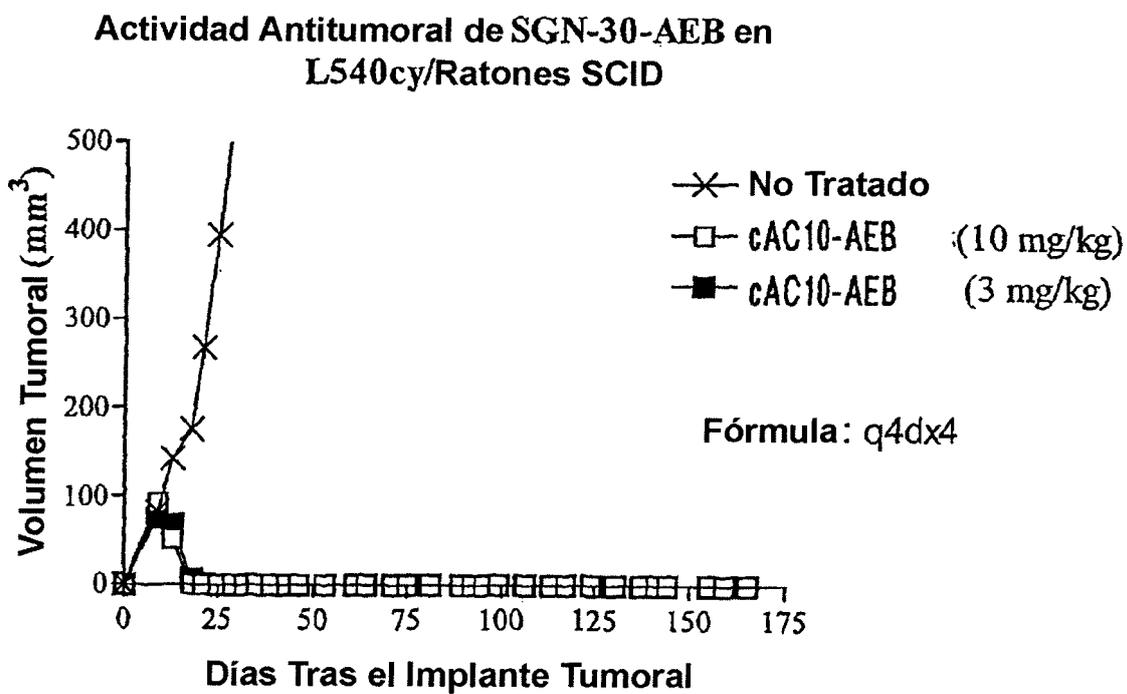


FIG. 13

ES 2 339 333 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Seattle Genetics, Inc.

5 <120> ANTICUERPOS ANTI-CD30 RECOMBINANTES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 9632-022-228

10 <140> A Asignar

<141 > Concurrentemente En Este Documento

<160> 32

15

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

20 <211> 351

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(351)

30 <400> 1

cag atc cag ctg cag cag tot gga cct gag gtg gtg aag cct ggg got 48
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

35

tca gtg aag ata tcc tgc aag got tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

40

tat ata acc tgg gtg aag cag aag cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

45

gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

50

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aca tcc tcc agc aca gcc ttc 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

55

atg cag ctc agc ago ctg aca tot gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

60

gcg aac tat ggt aac tac tgg ttt got tac tgg ggc oaa ggg act cag 336
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

gtc act gtc tct gca 351
Val Thr Val Ser Ala
115

65

<210> 2

<211> 117

ES 2 339 333 T3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5 <400> 2

```

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

```

25

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

30

<213> *Mus musculus*

<400> 3

35

gactactata taacc

15

<210> 4

<211> 5

40

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

45

```

      Asp Tyr Tyr Ile Thr
      1           5

```

50

<210> 5

<211> 51

55

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 5

60

tggattatc ctggaagcgg taactaag tacaatgaga agttcaaggg c

51

<210> 6

65

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 339 333 T3

<400> 6

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

<210> 7

<211> >24

10 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 7

15 tatgtaact actggtttgc ttac

24

<210> 8

20 <211> 8

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25 <400> 8

Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr
 1 5

30 <210> 9

<211> 333

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

35

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(333)

40

<400> 9

45 gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 50 cag agg gcc acc atc tcc tgc aag gcc agc caa agt gtt gat ttt gat 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30
 55 ggt gat agt tat atg aac tgg tac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 60 aaa gtc ctc atc tat gct gca tcc aat cta gaa tct ggg atc cca gcc 192
 Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 65 agg ttt agt ggc agt ggg tot ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 70 cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tao tgt cag caa agt aat 288
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 80 gag gat cag tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 333
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

ES 2 339 333 T3

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 10

```

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

```

25 <210> 11

<211> 45

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30

<400> 11

aaggccagcc aaagtgtga tttgatggt gatagtata tgaac

45

35

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

40 <213> *Mus musculus*

<400> 12

```

45     Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
        1           5           10           15

```

<210> 13

<211> 21

50 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 13

55

gctgcatcca atctagaatc t

21

<210> 14

60 <211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

65 <400> 14

```

      Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
        1           5

```

ES 2 339 333 T3

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> *Mus musculus*

<400> 15

10 cagcaaagta atgaggatcc gtggacg

27

<210> 16

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

20 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 17

25 <211> 375

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(375)

35 <400> 17

40	gag gtg aag ctg gtg gag tct gga gga ggc ttg gta cag cct ggg ggt	48
	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	tct ctg aga ctc tcc tgt gca act tct ggg ttc acc ttc agt gat tac	96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
	20 25 30	
45	tat atg aac tgg gto cgc cag cct cca gga aag gct ott gag tgg ttg	144
	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu	
	35 40 45	
50	ggt ttt att aga aac aaa gct aat ggt tac aca aca gag ttc agt gca	192
	Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala	
	50 55 60	
55	tct gtg atg ggt cgg ttc acc atc tcc aga gat gat tcc caa ago atc	240
	Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile	
	65 70 75 80	
	ctc tat ctt cag atg aac acc ctg aga gct gag gac agt gcc act tat	288
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr	
	85 90 95	
60	tac tgt gca aga gat ccc ccc tat ggt aac ccc cat tat tat gct atg	336
	Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met	
	100 105 110	
65	gac tac tgg ggt caa gga acc toa gtc acc gtc tcc tca	375
	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
	115 120 125	

ES 2 339 333 T3

<210> 18

<211> 125

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 18

```

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

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

```

30 <210> 19

<211> 15

<212> ADN

35 <213> *Mus musculus*

<400> 19

40 gattactata tgaac

15

<210> 20

<211> 5

45 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 20

```

50      Asp Tyr Tyr Met Asn
        1          5

```

55 <210> 21

<211> 57

<212> ADN

60 <213> *Mus musculus*

<400> 21

65 ttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagagtca gtgcatctgt gatgggt

57

<210> 22

ES 2 339 333 T3

<211> 19

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5

<400> 22

10 Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Met Gly

<210> 23

15

<211> 42

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

20

<400> 23

 gatecccect atggtaacce ccattattat gctatggact ac

42

25

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

30

<213> *Mus musculus*

<400> 24

35 Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 25

40

<211> 333

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

45

<221> CDS

<222> (1)...(333)

50

55

60

65

ES 2 339 333 T3

<400> 25

```

    gag att gtg ctg acc cag tot cct gct tcc tta gct gtt tot ctg ggg      48
    Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
    1           5           10           15
    cag agg gcc acc atc tca tgc agg gcc agc aaa agt gtc agt gca tct      96
    Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
           20           25           30
    ggc tat aat tat atg cac tgg tac caa cag aaa gca ggg cag cca ccc      144
    Gly Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
           35           40           45
    aaa ctc ctc atc cat ctt gca tcc aac cta gaa tot ggg gtc cct gcc      192
    Lys Leu Leu Ile His Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
           50           55           60
    agg ttc agt ggc agt ggg tot ggg aca gac ttc acc ctc aac stc cat      240
    Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
           65           70           75           80
    cct gtg gag gag gag gat gct tca acc tat tac tgt cag cac agt ggg      288
    Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
           85           90           95
    gag ctt cca ttc acg ttc ggc tgg ggg aca aag ttg gaa ata aaa      333
    Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105           110

```

<210> 26

<211> 111

35 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 26

```

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

```

55 <210> 27

<211> 45

60 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 27

```

    65   aggccagca aaagtgcag tgcattggc tataattata tgcac      45

```

<210> 28

ES 2 339 333 T3

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5

<400> 28

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Asn Tyr Met His
1 5 10 15

10

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

15

<213> *Mus musculus*

<400> 29

20

cttgcatcca acctagaatc t

21

<210> 30

<211> 7

25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 30

30

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

35

<210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

40

<400> 31

cagcacagtg gggagcttcc attcacg

27

45

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

50

<213> *Mus musculus*

<400> 32

55

Gln His Ser Gly Glu Leu Pro Phe Thr
1 5

60

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Seattle Genetics, Inc.

65

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD30 RECOMBINANTES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 9632-022-228

ES 2 339 333 T3

<400> 2

1 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 5 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 10 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 15 Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 Val Thr Val Ser Ala
 115

20

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

25

<213> *Mus musculus*

<400> 3

30

gactactata taacc

15

<210> 4

<211> 5

35

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

40

Asp Tyr Tyr Ile Thr
 1 5

<210> 5

45

<211> 51

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

50

<400> 5

tggatttacc ctggaagcgg taatactaag tacaatgaga agttcaaggg c

51

55

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

60

<400> 6

65

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

<210> 7

ES 2 339 333 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 10

```

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

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

```

<210> 11

<211> 45

25 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 11

30 aagccagcc aaagtgtga tttgatggt gatagttata tgaac

45

<210> 12

35 <211> 15

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40 <400> 12

```

      Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
      1           5           10           15

```

45 <210> 13

<211> 21

<212> ADN

50 <213> *Mus musculus*

<400> 13

55 gctgcatcca atctagaatc t

21

<210> 14

<211> 7

60 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 14

```

65     Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
      1           5

```

ES 2 339 333 T3

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

5 <213> *Mus musculus*

<400> 15

10 cagcaaaagta atgaggatcc gtggacg

27

<210> 16

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

20

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 17

<211> 375

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30

<220>

<221> CDS

35

<222> (1)...(375)

<400> 17

40	gag gtg aag ctg qtg gag tot gga gga ggc ttg gta cag cct ggg ggt	48
	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	tct ctg aga ctc tcc tgt gca act tot ggg ttc acc ttc agt gat tac	96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
45	20 25 30	
	tat atg aac tgg gtc cgc cag cct cca gga aag gct ctt gag tgg ttg	144
	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu	
	35 40 45	
50	ggt ttt att aga aac aaa gct aat ggt tac aca aca gag ttc agt gca	192
	Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala	
	50 55 60	
	tot gtg atg ggt cgg ttc acc atc too aga gat gat tcc caa ago atc	240
55	Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile	
	65 70 75 80	
	ctc tat ctt cag atg aac acc ctg aga gct gag gac agt gcc act tat	288
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr	
60	85 90 95	
	tac tgt gca aga gat ccc ccc tat ggt aac ccc cat tat tat gct atg	336
	Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met	
	100 105 110	
65	gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	375
	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
	115 120 125	

ES 2 339 333 T3

<210> 18
 <211> 125
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*
 <400> 18

```

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

<210> 19
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> *Mus musculus*
 <400> 19

40 gattactata tgaac

15

<210> 20
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50 <400> 20

```

      Asp Tyr Tyr Met Asn
        1          5
  
```

<210> 21
 <211> 57
 60 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 21

65 ttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagagtcca gtgcatctgt gatgggt

57

ES 2 339 333 T3

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 22

10 Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Met Gly

15

<210> 23

<211> 42

<212> ADN

20 <213> *Mus musculus*

<400> 23

25 gatccccct atggaaccc ccattattat gctatggact ac

42

<210> 24

<211> 14

30 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 24

35

 Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

40

<210> 25

<211> 333

<212> ADN

45 <213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

50 <222> (1)...(333)

55

60

65

ES 2 339 333 T3

<400> 25

```

gac att gtg ctg acc cag tat cct gct tcc tta gct gtt tot ctg ggg      48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15

cag agg gcc acc atc tca tgc agg gcc ago aaa agt gtc agt gca tct      96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
           20           25           30

ggc tat aat tat atg cac tgg tac caa cag aaa gca ggg cag cca ccc      144
Gly Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
           35           40           45

aaa ctc ctc atc cat ctt gca tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc      192
Lys Leu Leu Ile His Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
           50           55           60

agg ttc agt ggc agt ggg tot ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat      240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65           70           75           80

cct gtg gag gag gag gat gct tca acc tat tac tgt cag cac agt ggg      288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
           85           90           95

gag ctt cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gaa ata aaa      333
Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105           110

```

<210> 26

<211> 111

35 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 45

60 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 27

65 agggccagca aaagtgtcag tgcactgtgc tataattata tgcac

45

<210> 28

