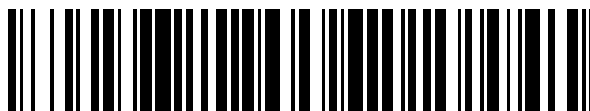


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 569**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2007** **E 07718000 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012** **EP 1976883**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra CD30 que carecen de restos fucosilo y xilosilo**

30 Prioridad:

17.01.2006 US 759298 P

07.04.2006 US 790373 P

11.04.2006 US 791178 P

09.06.2006 US 812702 P

11.08.2006 US 837202 P

11.08.2006 US 836998 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2013

73 Titular/es:

MEDAREX, INC. (50.0%)

Route 206 & Province Line Road

Princeton, NJ 08540, US y

SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

BLACK, AMELIA, NANCY;

PASSMORE, DAVID, B.;

SRINIVASAN, MOHAN;

DICKEY, LYNN, F.;

COX, KEVIN, M.;

PEELE, CHARLES, G. y

WANG, MING-BO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 396 569 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra CD30 que carecen de restos fucosilo y xilosilo

5 Antecedente de la invención

La molécula de superficie celular CD30 es un miembro de la superficie del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Esta familia de moléculas tiene homología variable entre sus miembros e incluye el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), CD120(a), CD120(b), CD27, CD40 y CD95. Estas moléculas se caracterizan típicamente por la presencia de múltiples repeticiones ricas en cisteína en la región extracitoplasmática (de Bruin, P.C., et al. *Leukemia* 9:1620-1627 (1995)). Los miembros de esta familia se consideran cruciales para regular la proliferación y diferenciación de linfocitos.

CD30 es una glucoproteína transmembrana tipo I con seis (seres humanos) o tres (murino y de rata) repeticiones ricas en cisteína con una secuencia bisagra central. CD30 existe como una molécula de membrana de 120 kDa que se desarrolla a partir de una proteína precursora intercelular de 90 kDa. Se desprende de la superficie celular como una proteína soluble (sCD30) de aproximadamente 90 kDa. El desprendimiento de sCD30 sucede como un proceso activo de células CD30 viables y no está simplemente causado por la liberación de células que se están muriendo o muertas. Los ADNc que codifican la proteína CD30 se han clonado a partir de bibliotecas de expresión de la línea de células T humanas HLTV-1 HUT-102 por inmunoexploración con anticuerpos monoclonales Ki-1 y Ber-H2 (Schwab, U., et al. *Nature* 299:65 (1982)). El ADNc de CD30 de ratón y rata se ha descubierto que codifica 498 y 493 aminoácidos, respectivamente. El ADNc de CD30 humana codifica 90 aminoácidos adicionales, parcialmente duplicados desde uno de los dominios ricos en cisteína. El gen de CD30 se ha mapeado en 1p36 en seres humanos y 5q36.2 en ratas.

CD30 se expresa preferentemente por células linfoides activadas. Específicamente, la estimulación de CD30 en células linfoides ha demostrado inducir efectos biológicos pleiotrópicos, incluyendo proliferación, activación, diferenciación y muerte celular, dependiendo del tipo celular, fase de diferenciación y presencia de otros estímulos (Gruss, H.J. et al., *Blood* 83:2045-2056 (1994)). CD30 se identificó originalmente por el anticuerpo monoclonal Ki-1, que es reactivo con antígenos expresados en células de Hodgkin y Reed-Sternberg de enfermedad de Hodgkin (Schwab et al., *Nature* 299:65 (1982)). Por consiguiente, CD30 se usa ampliamente como marcador clínico para linfoma de Hodgkin y malignidades hematológicas relacionadas (Froese et al., *J. Immunol.* 139:2081 (1987); Carde et al., *Eur. J. Cancer* 26:474 (1990)).

CD30 demostró posteriormente que se expresaba en un subconjunto de linfomas no Hodgkin (NHL), incluyendo el linfoma de Burkitt, linfomas de células grandes anaplásicas (ALCL), linfoma cutáneo de células T, linfomas de células escindidas pequeñas celulares, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T en adulto (T-ALL), y linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cd/cc) (Stein et al., *Blood* 66:848 (1985); Miettinen, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:1197 (1992); Piris et al., *Histopathology* 17:211 (1990); Burns et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 93:327(1990); y Eckert et al., *Am. J. Dermatopathol.* 11:345(1989)), así como varias líneas transformadas de forma vírica tales como células T transformadas con virus linfotrópico de células T humanas I o II, y células B transformadas con el virus de Epstein-Barr (Stein et al., *Blood* 66:848 (1985); Andreesen et al., *Blood* 63:1299 (1984)). Además, se ha documentado la expresión de CD30 en carcinomas embrionarios, carcinomas no embrionarios, melanomas malignos, tumores mesenquimáticos, y líneas celulares mieloides y macrófagos en fases tardías de diferenciación (Schwartz et al., *Blood* 74:1678 (1989); Pallesen et al., *Am J. Pathol.* 133:446 (1988); Mechttersheimer et al., *Cancer* 66:1732 (1990); Andreesen et al., *Am. J. Pathol.* 134:187 (1989)).

Como el porcentaje de células CD30 positivas en individuos normales es bastante pequeño, la expresión de CD30 en células tumorales la convierte en una diana importante para terapia mediada por anticuerpos para dirigir específicamente agentes terapéuticos contra células neoplásicas CD30 positivas (Chaiarle, R., et al. *Clin. Immunol.* 90(2):157-164 (1999)). Se ha demostrado que la terapia mediada por anticuerpos aumenta la citotoxicidad de células CD30 positivas tanto por la activación del complemento como por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCE) (Pohl C, et al. *Int J Cancer* 54:418 (1993)). Sin embargo, aunque los resultados obtenidos hasta la fecha establecen claramente a CD30 como una diana útil para inmunoterapia, también muestran que anticuerpos murinos actualmente disponibles no constituyen agentes terapéuticos ideales. La terapia pasiva con anticuerpos no ha sido eficaz *in vitro* o *in vivo* contra pacientes con enfermedad de Hodgkin refractaria. Un ensayo clínico del anticuerpo anti-CD30 Ber-H2 mostró la localización del anticuerpo, pero sin respuestas (Falini B. et al. (1992) *Brit J Haematol.* 82:38-45; Koon, H.B. et al. (2000) *Curr Opin in Oncol.* 12:588-593). A través del acoplamiento de un anticuerpo anti-CD30 a una toxina de ricina desglucosilada-toxina de cadena A, se mostró citotoxicidad en el tratamiento de enfermedad de Hodgkin en un modelo de ratón SCID, aunque también se observaron toxicidades de grado 3 en los sujetos (Schell, R. et al. (2002) *Annals of Oncology* 13:57-66). El documento WO03/059282 describe la caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-CD30 humanos 5F11, 17G1 y 2H9. Borchmann et al (*Blood*; 2003; 102(10) p3737-3742) también describe la caracterización del anticuerpo 5F11. Shinkawa et al (*Journal of Biological Chemistry*; 2003; 278(5) p3466-3473) y Yamane-Ohnuki et al (*Biotechnology and Bioengineering*; 2004; 87(5) p614-622) describen métodos para producir anticuerpos que carecen de fucosa que tienen ADCC potenciada.

Se han abordado varias especies de plantas para su uso en "cría molecular" de proteínas de mamífero de interés farmacéutico. Estos sistemas de expresión vegetales proporcionan una producción de bajo coste de proteínas de mamífero biológicamente activas y son fácilmente susceptibles a un aumento en escala rápido y económico (Ma et al. (2003) Nat. Rev. Genet. 4:794-805; Raskin et al. (2002) Trends Biotechnol. 20:522-531). Gasdaska et al (Bioprocessing; 2003; 2 p49-56) y el documento US 2004/261148 describen la producción de proteínas terapéuticas incluyendo anticuerpos, usando la planta acuática *Lemna* (lenteja acuática). Las diferencias en los patrones de glucosilación entre plantas y mamíferos ofrecen un reto a la factibilidad de sistemas de expresión vegetales para producir proteínas de mamífero recombinantes de alta calidad para uso farmacéutico. Se necesitan métodos para alterar el patrón de glucosilación en proteínas expresadas en plantas, específicamente para inhibir la glucosilación específica de plantas de la estructura núcleo eucariota, para producir de forma ventajosa proteínas de mamífero recombinantes con un patrón de glucosilación humanizado.

Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos mejorados contra CD30 que sean más eficaces para tratar y/o prevenir enfermedades mediadas por CD30.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD30 glucosilado aislado, donde al menos un 90% es una glucoforma individual, que carece de los restos fucosilo y xilosilo, y que, opcionalmente, no contiene restos galactosilo.

En otro aspecto, la invención se refiere a:

- una composición de glucoproteína que comprende una composición de anticuerpo anti-CD30 que comprende un perfil de *N*-glucosilación donde al menos el 90% de las especies de *N*-glucanos presentes en dicho perfil son GlcNAc2Man3GlcNAc2 (G0), comprendiendo dicho perfil una cantidad traza de especies precursoras de *N*-glucano, donde dicha especie precursora de *N*-glucano se selecciona entre Man3GlcNAc2, GlcNAc1Man3GlcNAc2 donde GlcNAc está unido al brazo de 1,3 manosa (MGn), GlcNAc1Man3GlcNAc2 donde GlcNAc está unido al brazo 1,6 manosa (GnM), y cualquier combinación de los mismos;
- una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o composición de glucoproteína de la invención;
- una célula hospedadora que comprende una composición de glucoproteína de la invención;
- una célula hospedadora que comprende los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-CD30, donde dicha célula hospedadora carece de una fucosiltransferasa y una xilosiltransferasa de modo que el anticuerpo anti-CD30 expresado por dicha célula hospedadora carece de los restos fucosilo y xilosilo, donde la célula hospedadora es opcionalmente una célula vegetal, donde la célula vegetal es opcionalmente un miembro de la familia *Lemnaceae*, tal como *Lemna minor*;
- un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de células CD-30⁺ tales como células tumorales que comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-CD30, donde al menos el 90% es una glucoforma individual, que carece de los restos fucosilo y xilosilo, en condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de dichas células; y
- un anticuerpo anti-CD30, donde al menos el 90% es una glucoforma individual, que carece de restos fucosilo y xilosilo, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD-30 o en un método para tratar un trastorno autoinmune.

El anticuerpo de la presente invención se une a CD30 e inhibe el crecimiento de células que expresan CD30 potenciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas (por ejemplo, monocitos o células mononucleares), en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo media la ADCC aumentada de células que expresan CD30 en presencia de células efectoras humanas pero no en presencia de células efectoras de ratón.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado o quimérico. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o quimérico se prepara a partir de un anticuerpo anti-CD30 de ratón seleccionado entre el grupo que consiste en: AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, Ber-H8. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de glucoproteína que comprende una composición de anticuerpo, donde la composición de anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 7, 8, y 9;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 10, 11, y 12;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 13, 14, y 15;

- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 16, 17, y 18;
 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 19, 20, y 21;
 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 22, 23, y 24.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de glucoproteína que comprende una composición de anticuerpo, donde la composición de anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 7, una CDR2 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 10, una CDR3 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 13, una CDR1 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 16, una CDR2 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 19 y una CDR3 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 22;
 (b) una CDR1 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 8, una CDR2 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 11, una CDR3 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 14, una CDR1 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 17, una CDR2 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 20 y una CDR3 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 23;
 (c) una CDR1 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 9, una CDR2 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 12, una CDR3 de región variable de cadena pesada humana que comprende la SEC ID N° 15, una CDR1 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 18, una CDR2 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 21 y una CDR3 de región variable de cadena ligera humana que comprende la SEC ID N° 24; o una región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 1, 2 y 3 y una región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 4, 5 y 6.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de glucoproteína que comprende una composición de anticuerpo, donde la composición de anticuerpo comprende:

- (a) la región variable de cadena pesada de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N: 1 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4;
 (b) la región variable de cadena pesada de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N: 2 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5; o
 (c) la región variable de cadena pesada de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N: 3 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de glucoproteína que comprende una composición de anticuerpo, donde la composición de anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que es un producto de o se obtiene de un gen humano V_H 4-34 ó V_H 3-07 y/o una región variable de cadena ligera que es un producto de o se obtiene de un gen humano V_k L15, A27 ó L6.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 30) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 1) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F11. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 7), CDR2 (SEC ID N° 10) y CDR3 (SEC ID N° 13) están delimitadas y están indicadas las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 33) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 4) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F11. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 16), CDR2 (SEC ID N° 19) y CDR3 (SEC ID N° 22) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 31) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 2) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 17G1. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 8), CDR2 (SEC ID N° 11) y CDR3 (SEC ID N° 14) están delimitadas y están indicadas las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 34) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 5) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 17G1. Las regiones CDR1 (SEC ID

Nº 17), CDR2 (SEC ID Nº 20) y CDR3 (SEC ID Nº 23) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº 32) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 3) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2H9. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº 9), CDR2 (SEC ID Nº 12) y CDR3 (SEC ID Nº 15) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº 35) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 6) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2H9. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº 18), CDR2 (SEC ID Nº 21) y CDR3 (SEC ID Nº 24) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de eliminación celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de Hodgkin humano L540, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).

La Figura 5 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de eliminación celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de Hodgkin humano L428, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).

La Figura 6 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de eliminación celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de Hodgkin humano L1236, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).

La Figura 7 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de eliminación celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de células T humano Karpas, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).

Las Figuras 8A-8B muestran las secuencias de aminoácidos de las líneas germinales humanas V_H 4-34, V_H 3-07, V_K L15, V_K A27, y V_K L6 (SEC ID Nº 25-29, respectivamente), las CDR están delimitadas.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el bloqueo de la actividad ADCC con un anticuerpo anti-CD16.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de eliminación celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 en presencia de células efectoras de ratón (panel de la izquierda) o humanas (panel de la derecha).

La Figura 11 es un gráfico que muestra un ensayo de ADCC usando sangre de mono cynomolgus.

La Figura 12 muestra la actividad glucosiltransferasa en líneas de *Lemna* tipo silvestre y 5F11 LEX^{Opt} ARNi. Se incubaron membranas microsómicas de plantas tipo silvestre (WT) y 5F11 LEX^{Opt} ARNi (se indican los números de línea) en presencia de un tampón de reacción que contenía GDP-Fuc, UDP-Xil y aceptor GnGn-dabsil-péptido. Se midieron los picos de masa correspondientes a productos fucosilados (barras blancas) o xilosilados (barras negras) sintetizados por microsomas de cada línea por MS MALDI-TOF en modo reflectrón positivo y se normalizaron, en porcentaje, al control positivo WT. Membranas de tipo silvestre hervidas (BWT) indican recuentos iónicos de fondo.

La Figura 13 muestra SDS-PAGE de extractos vegetales y muestras purificadas de proteína A o hidroxipatita de 5F11 LEX^{Opt} en condiciones no reductoras (Figura 13A) y reductoras (Figura 13B) respectivamente. Se usó mAb purificado de una línea celular CHO (5F11 CHO) como control positivo. Se incluyeron marcadores de peso molecular Mark12 en los geles. Los geles se tiñeron con Azul Coloidal.

La Figura 14 muestra los espectros obtenidos del análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF en modo reflectrón negativo de *N*-glucanos 2-AA marcados de mAb 5F11 expresados en CHO (5F11 CHO), *Lemna* tipo silvestre (5F11 LEX), o *Lemna* transformado con la construcción de ARNi XylT/FucT (5F11 LEX^{Opt}). Los picos significativos se identifican por la masa correspondiente ([M-H]⁺). El * indica la localización de los artefactos de matriz.

La Figura 15 muestra los espectros obtenidos del análisis MS NP-HPLC-QTOF de *N*-glucanos 2-AA marcados librados de mAb 5F11 expresados en CHO (5F11 CHO), *Lemna* tipo silvestre (5F11 LEX), o *Lemna* transformado con la construcción de ARNi XylT/FucT (5F11 LEX^{Opt}). Los *N*-glucanos 2-AA marcados se separaron por cromatografía en fase normal y se detectaron por fluorescencia. Los picos más abundantes de cada muestra (marcados a-i) se caracterizaron por MS QTOF en modo negativo en línea y se muestran sus espectros de masa QTOF correspondientes ([M-2H]²⁺).

La Figura 16 muestra la actividad *in vitro* de mAb 5F11 medida por análisis citométrico de flujo de mAb 5F11 CHO, LEX, o LEX^{Opt} gluco-optimizado que se unen a CD30 expresado en células L540. Las células L540 se incubaron con concentraciones crecientes del anticuerpo indicado como se resume a continuación en el Ejemplo 6 en este documento. La Intensidad de Fluorescencia Media Geo (GMFI) se representa frente a las diversas concentraciones de mAb usadas. ■: 5F11 CHO; ▲: 5F11 LEX; ▼: 5F11 LEX^{Opt}.

La Figura 17 muestra la unión en equilibrio de mAb gluco-optimizado y tipo silvestre de dos alotipos humanos de FcγRIIIa (Val¹⁵⁸ o Phe¹⁵⁸). La señal de unión como función de FcγRIIIa se ajustó a un modelo de unión de un sitio. ■: 5F11 CHO; ▲: 5F11 LEX; ▼: 5F11 LEX^{Opt}.

La Figura 18 muestra la actividad ADCC de mAb 5F11 obtenido de CHO, LEX (glucosilación de *Lemna* tipo silvestre), o LEX^{Opt} (*Lemna* transgénica con ARNi). Las células efectoras humanas de un donante homocigótico FcγRIIIaPhe/Val¹⁵⁸ y un donante heterocigótico FcγRIIIaPhe/Val¹⁵⁸ se incubaron con células L540 marcadas con BATDA a una proporción efector:diana de 50:1 en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos indicados. Se representa el porcentaje específico de lisis de cada concentración de mAb. Se usó el mAb1 humano que no reconoce el antígeno en células L540 como control de isotipo en todos los experimentos. Los valores de EC₅₀ (μg/ml), las constantes de unión y el porcentaje máximo de lisis se calcularon usando el software GraphPad Prism 3.0. ■: 5F11 CHO; ▲: 5F11 LEX; ▼: 5F11 LEX^{Opt}.

La Figura 19 muestra el análisis de masa intacta de las composiciones de mAb 5F11 LEX producidas en *L. minor* tipo silvestre que comprende la construcción MDXA01. Cuando no se suprime la expresión de XylIT y FucT en *L. minor*, la composición de mAb 5F11 LEX producido de forma recombinante comprende al menos 7 glucoformas diferentes, siendo la glucoforma G0XF³ la especie predominante presente. Obsérvese la ausencia de un pico que represente la glucoforma G0.

La Figura 20 muestra el análisis de masa de glucano de la cadena pesada del mAb 5F11 LEX producida en *L. minor* de tipo silvestre que comprende la construcción MDXA01. Cuando no se suprime la expresión de XylIT y FucT en *L. minor*, la especie de *N*-glucano predominante presente es GOXF³, con picos principales adicionales que reflejan la especie G0X. Obsérvese la presencia minoritaria de la especie de glucano G0.

La Figura 21 muestra el análisis de masa intacta de las composiciones de mAb 5F11 LEX producidas en *L. minor* transgénico que comprende la construcción MDXA04. Cuando se suprime la expresión de XylIT y FucT en *L. minor*, la composición de mAb intacta contiene solamente *N*-glucanos G0. Además, la composición es sustancialmente homogénea para la glucoforma G0 (pico 2), donde ambos sitios de glucosilación están ocupados por la especie de *N*-glucano G0, con dos picos minoritarios que reflejan cantidades traza de las glucoformas precursoras (pico 1, que muestra el mAb que tiene una región Fc donde el dominio C_H2 de una cadena pesada tiene una especie de glucano G0 unida a Asn 297, y el dominio C_H2 de la otra cadena pesada está no glucosilado; y el pico 3, que muestra el mAb que tiene una región Fc donde el sitio de glucosilación Asn 297 en cada uno de los dominios C_H2 tiene una especie de glucano G0 unida, con una tercera especie de glucano G0 unida a un sitio de glucosilación adicional dentro de la estructura del mAb).

La Figura 22 muestra el análisis de masa de glucano de la cadena pesada del mAb 5F11 LEX^{Opt} producido en *L. minor* transgénico que comprende la construcción MDXA04. Cuando se suprime la expresión de XylIT y FucT en *L. minor*, la única especie de *N*-glucano fácilmente detectable está unida a los sitios de glucosilación Asn 297 de los dominios C_H2 de la cadena pesada es G0.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD30 glucosilado aislado, donde al menos el 90% es una glucoforma individual, que carece de restos fucosilo y xilosilo, y que, opcionalmente, no contiene restos galactosilo.

Además, los anticuerpos muestran eliminación citotóxica celular dirigida por anticuerpos (ADCC) potenciada de células CD30+. En una realización, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos completamente humanos y son particularmente útiles para el tratamiento terapéutico en seres humanos de trastornos asociados con células que expresan CD30. También se incluyen por la invención métodos para usar anticuerpos anti-CD30 para tratamiento terapéutico (por ejemplo, para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con la expresión de CD30).

Para que la invención pueda entenderse más fácilmente, a continuación se definirán ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales durante toda la descripción detallada.

Los términos "CD30" y "antígeno CD30" se usan de forma intercambiable en este documento, e incluyen cualquier variante, isoformas y homólogo de especie de CD30 humana que se expresan de forma natural por células. La secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD30 humana tiene el número de acceso a Genbank NP_001234. La secuencia completa de ADNc que codifica la proteína CD30 humana tiene el número de acceso a Genbank NM_001234.

Como se usa en este documento, las expresiones "anticuerpo que carece de restos fucosil", "anticuerpo desfucosilado", y "anticuerpo no fucosilado" se usan de forma intercambiable y pretenden hacer referencia a un anticuerpo en el que la parte carbohidrato del anticuerpo no contiene un resto fucosilo o del cual se ha eliminado el resto fucosilo. Un anticuerpo que carece de restos fucosilo puede generarse, por ejemplo, por expresión del anticuerpo en una célula o sistema de expresión que minimiza o no une restos fucosilo a la cadena carbohidrato del anticuerpo, o por modificación química del anticuerpo para eliminar los restos fucosilo de la cadena carbohidrato (por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con una fucosidasa). Por tanto, las expresiones "carecer de restos fucosilo" y "desfucosilado" no pretenden limitarse por el mecanismo por el cual se prepara el anticuerpo con estructura carbohidrato alterada.

Como se usa en este documento, las expresiones "anticuerpo que carece de restos xilosilo", "anticuerpo desxilosilado", y "anticuerpo no xilosilado" se usan de forma intercambiable y pretenden hacer referencia a un anticuerpo en el que la parte carbohidrato del anticuerpo no contiene un resto xilosilo o del cual se ha eliminado el resto xilosilo. Un anticuerpo que carece de restos xilosilo puede generarse, por ejemplo, por expresión del anticuerpo en una célula o sistema de expresión que minimiza o no une restos xilosilo a la cadena carbohidrato del anticuerpo, o por modificación química del anticuerpo para eliminar los restos xilosilo de la cadena carbohidrato (por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con una xilosidasa). Por tanto, las expresiones "carecer de restos xilosilo" y "desxilosilado" no pretenden limitarse por el mecanismo por el cual se prepara el anticuerpo con estructura carbohidrato alterada.

Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo que expresa restos fucosilo" y "anticuerpo fucosilado" se usan de forma intercambiable y pretenden hacer referencia a un anticuerpo en el cual la parte carbohidrato del anticuerpo contiene fucosilo.

Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo que expresa restos xilosilo" y "anticuerpo xilosilado" se usan de forma intercambiable y pretenden hacer referencia a un anticuerpo en el cual la parte carbohidrato del anticuerpo contiene xilosilo.

Para los propósitos de la presente invención, las expresiones "N-glucano", "glucano N-ligado", y "glucano" se usan de forma intercambiable y hacen referencia a un oligosacárido N-ligado, por ejemplo, uno que está o estuvo unido por un resto N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligado al nitrógeno amida de un resto de asparagina en una proteína. Los azúcares predominantes encontrados en glucoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosilo, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), y ácido siálico (por ejemplo, ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)). El procesamiento de los grupos azúcar sucede de forma cotraduccional en la luz del RE y continua en el aparato de Golgi para glucoproteínas N-ligadas.

Los N-glucanos unidos a glucoproteínas difieren con respecto a la cantidad de ramificaciones (antenas) que comprenden azúcares periféricos (por ejemplo, GlcNAc, galactosa, fucosilo, y ácido siálico) que se añaden a la estructura núcleo trimanosa. Los N-glucanos se clasifican comúnmente de acuerdo con sus constituyentes ramificados (por ejemplo, complejos, alto contenido en manosa, o híbridos). Un N-glucano tipo "complejo" típicamente tiene al menos una GlcNAc unida al brazo 1,3 manosa y al menos una GlcNAc unida al brazo 1,6 manosa de un núcleo "trimanosa". Cuando se une una GlcNAc a cada brazo de manosa, la especie de glucano N-ligado se indica en este documento como "GlcNAc2Man3GlcNAc2" o "GnGn". Cuando se une solamente una GlcNAc, la especie N-glucano se indica en este documento como "GlcNAc1Man3GlcNAc2", donde la GlcNAc está unida cualquiera del brazo 1,3 manosa (indicado "MGn" en este documento) o al brazo 1,6 manosa (indicado "GnM" en este documento) (véase la Figura 30). Los N-glucanos complejos también pueden tener restos de azúcar galactosa ("Gal") o N-acetilgalactosamina ("GalNAc") que están opcionalmente modificados con ácido siálico o derivados (por ejemplo, "NeuAc", donde "Neu" se refiere a ácido neuramínico y "Ac" se refiere a acetilo). Cuando se une un resto de azúcar galactosa a cada GlcNAc en cada brazo de manosa, la especie de glucano N-ligado se indica en este documento como "Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2". Los N-glucanos complejos también pueden tener sustituciones intracatenarias que comprenden GlcNAc "de bisección" y fucosilo núcleo ("Fuc"). Los N-glucanos complejos también pueden tener múltiples antenas en el "núcleo trimanosa", a menudo mencionadas como "glucanos de antenas múltiples". Un N-glucano tipo "de elevado contenido en manosa" tiene cinco o más restos de manosa. Un N-glucano "híbrido" tiene al menos una GlcNAc en el extremos del brazo 1,3 manosa del núcleo trimanosa y cero o más manosas en el brazo 1,6 manosa del núcleo trimanosa.

Las expresiones "glucano G0" y "estructura de glucano G0" y "especie de glucano G0" se usan de forma intercambiable y pretenden indicar el glucano N-ligado complejo que tiene la estructura GlcNAc2Man3GlcNAc2, donde no están presentes ácidos siálicos terminales (NeuAc) o restos de azúcar galactosa (Gal) terminales. Si un glucano G0 comprende un resto fucosilo ("Fuc") unido a la estructura núcleo trimanosa, se menciona en este documento como "glucano G0F3" (que tiene el resto fucosilo α 1,3-ligado específico de plantas) o "glucano G0F6" (que tiene el resto fucosilo α 1,6-ligado de mamíferos). En plantas, un glucano G0 que comprende el resto xilosilo β 1,2-ligado específico de plantas unido a la estructura núcleo trimanosa se menciona en este documento como "glucano G0X", y un glucano G0 que comprende tanto el resto xilosilo β 1,2-ligado específico de plantas como el resto fucosilo α 1,3-ligado específico de plantas unidos a la estructura núcleo trimanosa se menciona en este documento como "glucano G0XF3".

Las expresiones "sustancialmente homogéneo", "sustancialmente uniforme", "sustancialmente una gluciforma individual", y "homogeneidad sustancial" en el contexto de un perfil de glucosilación para una composición de glucoproteína o producto de glucoproteína se usan de forma intercambiable y pretenden indicar un perfil de glucosilación donde al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos el 99% de la especie N-glucano total en el perfil están representadas por una especie de N-glucano deseada, con una cantidad traza de especie N-glucano precursora que aparece en el perfil. Por "cantidad traza" se entiende que cualquier especie de N-glucano precursor que esté presente en el perfil de glucosilación está presente en menos del 5%, preferiblemente menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, e incluso menos del 0,5% o incluso menos del 0,1% de la cantidad total de especie de N-glucano que aparece en el perfil. Por especie de N-glucano "precursor" se entiende una especie de N-glucano que está incompletamente procesado. Los ejemplos de especies de N-glucano precursor presentes en cantidades traza en las composiciones de glucoproteína o productos de glucoproteína de la invención, y que por tanto aparecen en los perfiles de glucosilación de los mismos, son las especies de N-glucano precursores Man3GlcNAc2, MGn (GlcNAc1Man3GlcNAc2 donde GlcNAc1 está unido al brazo 1,3 manosa), y GnM (GlcNAc1Man3GlcNAc2 donde GlcNAc1 está unido al brazo 1,6 manosa) descritos anteriormente.

Por tanto, por ejemplo, cuando la especie de N-glucano deseado en un producto o composición de glucoproteína es G0, un perfil de glucosilación sustancialmente homogéneo para ese producto o composición sería uno en el que al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, o al menos el 99% de la cantidad total de especie de N-glucano que aparece en el perfil de glucosilación para el producto o composición está representado por la especie de glucano G0, con una cantidad traza de especie de N-glucano precursor que aparece en el perfil de glucosilación. Para dicha composición, una especie de N-glucano precursor representativo que aparece en su perfil de glucosilación sería la especie de N-glucano precursor Man3GlcNAc2, MGn

(GlcNac1Man3GlcNAc2 donde GlcNac1 está unido al brazo 1,3 manosa), y GnM (GlcNac1Man3GlcNAc2 donde GlcNac1 está unido al brazo 1,6 manosa) descritos anteriormente.

El término "gluco-optimizado" se refiere a un anticuerpo que tiene una estructura N-glucano particular que produce ciertas propiedades deseables, incluyendo, aunque sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) potenciada y actividad de unión al receptor de la célula efectora en comparación con anticuerpos expresados en CHO.

La expresión "lenteja acuática" se refiere a miembros de la familia *Lemnaceae*. Esta familia actualmente está dividida en cinco géneros y 38 especies de lentejas acuáticas del siguiente modo: género *Lemna* (*L. aequinoctialis*, *L. disperma*, *L. ecuadoriensis*, *L. gibba*, *L. japonica*, *L. minor*, *L. miniscula*, *L. obscura*, *L. perpusilla*, *L. tenera*, *L. trisulea*, *L. turionifera*, *L. valdiviana*); género *Spiroddla* (*S. intermedia*, *S. polyrrhiza*, *S. punctata*); género *Wolffia* (*Wa. angusta*, *Wa. arrhiza*, *Wa. australina*, *Wa. borealis*, *Wa. brasiliensis*, *Wa. columbiana*, *Wa. elongata*, *Wa. globosa*, *Wa. microscopica*, *Wa. neglecta*); género *Wolffiella* (*Wl. caudata*, *Wl. denticulata*, *Wl. gladiata*, *Wl. hyalina*, *Wl. lingulata*, *Wl. repunda*, *Wl. rotunda*, y *Wl. neotropica*) y género *Landoltia* (*L. punctata*). Cualquier otro género o especie de *Lemnaceae*, si existiera, también son aspectos de la presente invención. Las especies de *Lemna* pueden clasificarse usando el esquema taxonómico descrito por Landolt (1986) *Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The family of Lemnaceae-A Monograph Study* (Geobotanischen Institut ETH, Stiftung Rubel, Zurich).

La expresión "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y el complemento) que produce un daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en el caso de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre diversas moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una parte de una célula a otra parte de una célula. Como se usa en este documento, la expresión "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor CD30.

Como se usa en este documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmune. Células inmunes ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citotóxicas (CTL)), células eliminadoras, células eliminadoras naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos, y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y realizan funciones inmunes específicas. En realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, monocitos y macrófagos que expresan FcR están implicados en la eliminación específica de células diana y la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune, o la unión a células que presentan antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o célula diana. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citoquinas. Por ejemplo, la expresión de Fc α RI se ha descubierto que está regulada positivamente por G-CSF o GM-CSF. Esta expresión potenciada aumenta la función efectora de células que albergan Fc α RI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

"Célula diana" se refiere a cualquier célula o patógeno cuya eliminación sería beneficiosa en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) y que puede dirigirse por una composición (por ejemplo, anticuerpo) de la invención. Por ejemplo, la célula diana puede ser una célula que expresa o sobre expresa CD30.

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a la reacción citotóxica mediada por células en la que una célula diana CD30+ con anticuerpo anti-CD30 unido se reconoce por una célula efectora que alberga receptores Fc y se lisa posteriormente sin la necesidad de implicación del complemento.

Como se usa en este documento, la expresión "potencia la ADCC" (por ejemplo, refiriéndose a células) pretende incluir cualquier aumento medible en la lisis celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti-CD30 que carece de restos fucosilo o xilosilo en comparación con la eliminación celular de la misma célula en contacto con un anticuerpo anti-CD30 fucosilado y xilosilado en presencia de células efectoras (por ejemplo, a una proporción de célula diana:células efectoras de 1:50), por ejemplo, un aumento en la lisis celular en al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, ó 325%.

El término "anticuerpo" como se refiere en este documento, incluye anticuerpos completos o cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L)

interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de aminoterminal a carboxiterminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos hospedadores o factores, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD30). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento ambivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento $F(ab')$, que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3ª edición 1993); (iv) un fragmento Fd que consta de los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv que consta de los dominios V_L y V_H de un brazo individual de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consta de un dominio V_H ; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes diferentes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que posibilite que se formen como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H aparezcan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden incluirse dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los especialistas en la técnica, y los fragmentos se exploran para su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en este documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para los genes humanos de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y ajuste de secuencias génicas humanas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones flanqueantes y CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se obtienen de y están relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en este documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de forma intercambiable en este documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretender hacer referencia a anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones flanqueantes como las regiones CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región

constante, la región constante también se obtiene de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos aminoacídicos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones flanqueantes como las regiones CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada. La expresión "anticuerpo monoclonal humano", como se usa en este documento, también incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes humanos de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y ajuste de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones flanqueantes y CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD30 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de CD30). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, y su forma o variante de CD30 humana puede, sin embargo, tener actividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otra especie (por ejemplo, homólogos de especie de CD30). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades se combinan en una composición bien definida.

La expresión "anticuerpo humanizado" pretende hacer referencia a anticuerpos en los que las secuencias CDR obtenidas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en las secuencias flanqueantes humanas. Pueden hacerse modificaciones adicionales en la región flanqueante dentro de las secuencias flanqueantes humanas.

La expresión "anticuerpo quimérico" pretende hacer referencia a anticuerpos en los que las secuencias de región variable se obtienen de una especie y las secuencias de región constante se obtienen de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se obtienen de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se obtienen de un anticuerpo humano.

Como se usa en este documento, un anticuerpo que "se une específicamente a CD30 humana" pretende hacer referencia a un anticuerpo que se une a CD30 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 5×10^{-8} M o menos, más preferiblemente 3×10^{-8} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente 5×10^{-9} M o menos.

La expresión "no se une sustancialmente" a una proteína o células, como se usa en este documento, indica que no se une o no se une con una elevada afinidad a la proteína o células, es decir, se une a la proteína o células con una K_D de 1×10^{-6} M o más, más preferiblemente 1×10^{-5} M o más, más preferiblemente 1×10^{-4} M o más, más preferiblemente 1×10^{-3} M o más, incluso más preferiblemente 1×10^{-2} M o más.

El término " K_{asoc} " o " K_a " como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " K_D ", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación, que se obtiene de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). los valores K_D para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferiblemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Como se usa en este documento, la expresión "elevada afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente de 5×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente de 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente de 5×10^{-9} M o menos e incluso más preferiblemente de 1×10^{-9} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "elevada afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de "elevada afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menos, más preferiblemente de 10^{-7} M o menos, incluso más preferiblemente de 10^{-8} M o menos.

El término "epítipo" indica un determinante proteico capaz de unirse específicamente a, o unirse específicamente por, un anticuerpo. Los epítopes habitualmente constan de agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopes conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Como se usa en este documento, "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es al menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de forma intercambiable en este documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se usa en este documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de cadena pesada.

El término "vector", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma funcional. Dichos vectores se mencionan en este documento como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus deficientes en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden hacer referencia no solamente a la célula objeto particular sino a la descendencia de dicha célula. Como pueden suceder ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser, de hecho, idéntica a la célula precursora, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en este documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, células *Lemna*, células CHO, transfectomas, y células linfocíticas.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

La expresión "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos anti-CD30 humanos cuando se inmuniza con antígeno CD30 y/o células que expresan CD30. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso para ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse de forma extracromosómica, como es el caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos o transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CD30 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

En las siguientes subsecciones se describen en detalle adicional diversos aspectos de la invención.

Anticuerpos anti-CD30 monoclonales humanos

Los anticuerpos preferidos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales anti-CD30 humanos. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-CD30 humanos incluyen los anticuerpos 5F11, 17G1 y 2H9, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en la publicación PCT WO 03/059282, la publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0006215 y Lahive y Cockfield LLP expediente del mandatario N° MXI-333-1. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 1, 2, y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en las SEC ID N° 4, 5, y 6, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CD30, las secuencias V_H y V_L pueden "mezclarse y aparearse" para crear otras moléculas de unión anti-CD30 de la invención. La unión a CD30 de dichos anticuerpos "mezclados y apareados" puede ensayarse usando los ensayos de unión bien conocidos en la técnica, tales como análisis FACS y ensayos ELISA. Preferiblemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y aparean, se reemplaza una secuencia V_H de un par V_H/V_L particular con una secuencia V_H estructuralmente similar. Así mismo, preferiblemente se reemplaza una secuencia V_L de un par V_H/V_L particular con una secuencia V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias V_H de 5F11 y 2H9 son particularmente susceptibles para mezcla y apareamiento, ya que estos anticuerpos usan secuencias V_H obtenidas de la misma secuencia de la línea germinal (V_H 4-34) y por tanto muestran similitud estructural.

En realizaciones particulares, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado y desxilosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 1, 2, y 3; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 4, 5, y 6;
- donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana.

Las combinaciones preferidas de cadena pesada y cadena ligera incluyen:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4; o
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5; o
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 5F11, 17G1, y 2H9, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 7, 8, y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 10, 11, y 12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 13, 14, y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_K de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 16, 17, y 18, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_K de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 19, 20, y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_K de 5F11, 17G1, y 2H9 se muestran en la SEC ID N° 22, 23, y 24, respectivamente. Las regiones CDR están delimitadas usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CD30 y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_K pueden "mezclarse y aparearse" (es decir, pueden mezclarse y aparearse las CDR de diferentes anticuerpos, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 de V_H y una CDR1, 2 y 3 de V_K) para crear otras moléculas de unión anti-CD30 de la invención. La unión a CD30 de dichos anticuerpos "mezclados y apareados" puede ensayarse usando ensayos de unión conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis FACS y ensayos ELISA. Preferiblemente, cuando se mezclan secuencias CDR de V_H y aparean, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular se reemplaza con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. Sí mismo, cuando se mezclan y aparean secuencias CDR de V_K, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_K particular preferiblemente se reemplaza con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. Será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que pueden crearse nuevas secuencias V_H y

V_L sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en este documento para los anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1, y 2H9.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 7, 8, y 9;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 10, 11, y 12;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 13, 14, y 15;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 16, 17, y 18;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 19, 20, y 21; y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 22, 23, y 24;

donde el anticuerpo se une específicamente a CD30.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 7;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 10;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 13;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 16;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 19 y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 22.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 8;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 11;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 14;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 17;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 20 y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 23.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 9;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 12;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 15;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 18;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 21 y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 24.

Es bien sabido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, en solitario puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno afín y que pueden generarse de forma predecible múltiples anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión en base a la secuencia común CDR3. Véase, por ejemplo, Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solamente la CDR3 del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD30 murino Ki-4); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (que describe anticuerpos recombinantes de glucoproteína-2 epitelial (EGP-2) usando solamente la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo murino parental MOC-31 anti-EGP-2); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos humanizados anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ usando un dominio CDR3 variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo LM609 murino anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y con capacidad de unión al mismo epítipo que el anticuerpo murino precursor con afinidades tan elevadas a más elevadas que el anticuerpo murino); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que describe que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión al antígeno); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 2529-2533 (1995) (que describe el injerto de secuencias CDR3 de cadena pesada de tres Fab (SI-1, SI-40, y SI-32) contra ADN placentario humano en la cadena pesada de un Fab anti-toxoide tetánico reemplazando de este modo el CDR3 de cadena pesada existente y demostrando que el dominio CDR3 en solitario confería especificidad de unión); y Ditzel et al., *J. Immunol.* 157: 739-749 (1996) (que describe estudios de injerto donde la transferencia de solamente el CDR3 de cadena pesada de un Fab poliespecífico precursor LNA3 a una cadena pesada de un

anticuerpo Fab p313 de unión a toxoide tetánico de IgG monoespecífico fue suficiente para retener la especificidad de unión del Fab precursor).

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera a partir de un anticuerpo obtenido de un animal humano o no humano, donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a CD30. En ciertos aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera a partir de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a CD30. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera a partir de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar al anticuerpo no humano precursor correspondiente.

En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, donde el anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a CD30. En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a CD30 y donde el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de la especificidad de unión a CD30 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a CD30. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera a partir de un anticuerpo humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar que el primer anticuerpo humano precursor correspondiente. En realizaciones preferidas, el primer anticuerpo humano es 5F11, 17G1 o 2H9.

Anticuerpos anti-CD30 que carecen de restos fucosilo y xilosilo y que tienen actividad ADCC potenciada

La presente invención también se refiere a un anticuerpo anti-CD30 defucosilado y desxilosilado con citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos (ADCC) potenciada contra células que expresan CD30 en comparación con la forma fucosilada y xilosilada del anticuerpo. En una realización preferida, un anticuerpo defucosilado y desxilosilado de la invención induce ADCC de células L1236 *in vitro*, donde la forma fucosilada y xilosilada del anticuerpo no induce ADCC, en condiciones de una concentración de anticuerpo de 0,1 µg/ml y una proporción de célula diana a célula efectora de 1:50. En otra realización preferida, un anticuerpo defucosilado y desxilosilado de la invención potencia la ADCC de células L540, L428 y Karpas *in vitro* en comparación con la forma fucosilada y xilosilada del anticuerpo, en condiciones de una concentración de anticuerpo de 0,1 µg/ml y una proporción de célula diana a célula efectora de 1:50.

La actividad ADCC aumentada de un anticuerpo defucosilado y desxilosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como un aumento en el porcentaje de lisis celular, en comparación con la forma fucosilada y xilosilada del anticuerpo, cuando la actividad ADCC se mide en las mismas condiciones para las dos formas (por ejemplo, mismas concentraciones de anticuerpo y mismas proporciones de célula diana a efectora). Preferiblemente, un anticuerpo anti-CD30 defucosilado y desxilosilado de la invención aumenta el porcentaje de lisis de células CD30+ en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo al menos 1,25 veces (es decir, la proporción del porcentaje de lisis de la forma defucosilada y desxilosilada a la forma fucosilada y xilosilada es al menos 1,25), más preferiblemente al menos 2 veces, incluso más preferiblemente al menos 2,5 veces e incluso más preferiblemente al menos 3 veces. En diversas realizaciones, la forma defucosilada y desxilosilada del anticuerpo aumenta el porcentaje de lisis de células CD30+ en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo de 1,25 a 3,25 veces, preferiblemente de 1,5 a 3,25 veces, incluso más preferiblemente de 1,65 a 3,25 veces, incluso más preferiblemente de 2,15 a 3,25 veces, e incluso más preferiblemente de 2,63 a 3,25 veces, preferiblemente en condiciones en las que el anticuerpo está a una concentración de 25 µg/ml y la proporción de célula diana a efectora es 1:50.

Adicionalmente o como alternativa, la actividad ADCC aumentada de un anticuerpo defucosilado y desxilosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como una potencia aumentada medida por una disminución en el valor de EC₅₀ para la forma defucosilada y desxilosilada, en comparación con la forma fucosilada y xilosilada. Esto puede cuantificarse por la proporción del EC₅₀ para la forma fucosilada y xilosilada a la forma defucosilada y desxilosilada. Preferiblemente, la proporción de EC₅₀ de la forma fucosilada y xilosilada a la forma defucosilada y desxilosilada para ADCC de células CD30+ es al menos 3 (es decir, el EC₅₀ de la forma defucosilada y desxilosilada es 3 veces inferior al EC₅₀ de la forma fucosilada y xilosilada), más preferiblemente, al menos 4, incluso más preferiblemente al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 15 o al menos 20. En diversas realizaciones, la proporción EC₅₀ de la forma fucosilada y xilosilada a la forma defucosilada y desxilosilada para ADCC de células CD30+ es de 2 a 27,1, más preferiblemente de 4 a 27,1, incluso más preferiblemente de 4,7 a 27,1, incluso más preferiblemente de 7,8 a 27,1, incluso más preferiblemente de 11,1 a 27,1. Preferiblemente, los valores de EC₅₀ se determinan en ensayos de ADCC que usan una proporción de célula diana a efectora de 1:50 y concentraciones de anticuerpo de 0,0001 µg/ml o mayor.

Ejemplos de líneas celulares CD30+ que pueden usarse en los ensayos de ADCC de la invención y contra las cuales un anticuerpo desfucosilado y desxilosilado de la invención muestra actividad ADCC potenciada, en comparación con la forma fucosilada y xilosilada del anticuerpo, incluyen células L540 (linfoma de Hodgkin humano; N° de depósito DSMZ ACC 72), células L428 (linfoma no Hodgkin; N° de depósito DSMZ ACC 197), células L1236 (linfoma de Hodgkin humano; N° de depósito DSMZ ACC 530) y células Karp4 (linfoma de células T humanas; N° de depósito DSMZ ACC 31). El efecto ADCC potenciado por anticuerpos anti-CD30 desfucosilados y desxilosilados puede producir actividad ADCC en células CD30+ a concentraciones de anticuerpo en que la ADCC no se observaría con la forma fucosilada y xilosilada del anticuerpo. Por ejemplo, en un ensayo de ADCC *in vitro* con una proporción de célula diana:efectora de 1:50, la ADCC debido a un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado y desxilosilado se observa con la línea celular CD30+ L1236 a concentraciones tan bajas como 0,005 µg/ml, mientras que no se detecta actividad ADCC con el anticuerpo anti-CD30 fucosilado y xilosilado a concentraciones tan elevadas como 0,1 µg/ml.

Desfucosilación y desxilosilación de anticuerpos anti-CD30

Los anticuerpos anti-CD30 (por ejemplo, anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y humanos) son conocidos en la técnica, y pueden usarse en la presente invención. En una realización, el anticuerpo anti-CD30 de la presente invención se modifica de modo que el anticuerpo carezca de restos fucosilo. Puede prepararse un anticuerpo que carezca de restos fucosilo por uno de una diversidad de métodos. Por ejemplo, el anticuerpo puede expresarse, usando tecnología de ADN recombinante, en una célula con un mecanismo alterado de glucosilación de modo que la adición de restos fucosilo a las cadena carbohidrato esté inhibida. Adicionalmente o como alternativa, un anticuerpo puede desfucosilarse a través de eliminación química del resto fucosilo.

En una realización, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de modo que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosilo en sus carbohidratos. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosilo en sus carbohidratos. Las líneas celulares FUT8^{-/-} Ms704, Ms705, y Ms709 se crearon por la alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores reemplazo (véase la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040110704 de Yamane et al. Y Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de modo que anticuerpos expresados en dicha línea celular muestran hipofucosilación mediante la reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6. Hanai et al. también describen líneas celulares que tienen de forma natural una baja actividad enzimática para añadir fucosilo a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida de unir fucosilo a carbohidratos Asn(297)-ligados, produciendo también la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO99/54342 de Umana et al., describe líneas celulares diseñadas para expresar glucosiltransferasas de modificación de glucoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas muestran estructuras GlcNAc de disección aumentadas que provocan actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

En otra realización, se expresa un anticuerpo anti-CD30 y se escinde el o los restos fucosilos usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los restos fucosilo de anticuerpos (Tarentino, A.L. et al., (1975) Biochem. 14:5516-23).

Adicionalmente, en otras realizaciones, también se modifican otras formas de glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede crearse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). Dichas modificaciones de carbohidrato pueden conseguirse por, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácido que provoquen la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región flanqueante de la región variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe en detalle adicional en las patentes de Estados Unidos N° 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

En otra realización, el anticuerpo anti-CD30 de la presente invención se modifica de modo que el anticuerpo carezca de restos fucosilo y xilosilo. Puede crearse un anticuerpo que carezca de restos fucosilo y xilosilo por uno de una diversidad de métodos. Por ejemplo, el anticuerpo puede expresarse, usando tecnología de ADN recombinante, en una célula vegetal con un mecanismo de glucosilación alterado de modo que la adición de restos fucosilo y xilosilo a las cadenas carbohidrato esté inhibida. Adicionalmente o como alternativa, puede desfucosilarse y desxilosidarse un anticuerpo a través de eliminación química del resto fucosilo y xilosilo.

Se han marcado como diana varias especies vegetales para su uso en "cría molecular" de proteínas de mamífero de interés farmacéutico. Puede modificarse genéticamente plantas superiores, particularmente plantas superiores que sirven como sistemas de expresión para proteínas recombinantes para uso farmacéutico, que se han transformado

de forma estable para producir glucoproteínas con un patrón de *N*-glucosilación alterado usando los métodos descritos en este documento para producir cualquier proteína recombinante de interés. Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales en plantas superiores, donde los anticuerpos monoclonales tienen un patrón de *N*-glucosilación que refleja una reducción en la cantidad de restos xilosilo β 1,2-ligados y restos fucosilo α 1,3-ligados en los glucanos *N*-ligados, y composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales recombinantes producidos usando hospedadores vegetales modificados genéticamente del modo expuesto en este documento. Los métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal son conocidos. En algunas realizaciones, el hospedador vegetal de interés es un miembro de la familia de las lentejas acuáticas. En algunas realizaciones, la planta que sirve como hospedador para producción recombinante del anticuerpo monoclonal es un miembro de la familia *Lemnaceae*, por ejemplo, una planta *Lemna*. *Lemna* es una planta superior acuática pequeña que se ha desarrollado para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes. El Sistema de Expresión *Lemna* (LEX SystemSM) posibilita una expansión clonal rápida de plantas transgénicas, secreción de proteínas transgénicas, altos rendimientos de proteína, contención completa, y tiene la ventaja adicional de bajos costes de manejo y capital. Se han producido de forma satisfactoria numerosas proteínas incluyendo mAb en *Lemna* con niveles de expresión rutinariamente en el intervalo del 6-8% de la proteína total soluble (TSP). Estos niveles de expresión, en combinación con el elevado contenido de proteína de *Lemna* y la rápida velocidad de crecimiento (36 horas de tiempo de duplicación), posibilitan la producción de >1g de mAb por kg de biomasa en un formato robusto y bien controlado.

Las plantas producen glucoproteínas con *N*-glucanos complejos que tienen un núcleo que alberga dos restos N-acetilglucosamina (GlcNAc) que es similar al observado en mamíferos. Sin embargo, en glucoproteínas vegetales este núcleo está sustituido por un resto xilosilo β -1,2-ligado (núcleo xilosilo), resto que no existe en seres humanos, epítopes Lewis^a, y un fucosilo α 1,3-ligado (núcleo α [1,3]-fucosilo) en lugar de un núcleo fucosilo α 1,6-ligado como en mamíferos (véase, por ejemplo, Lerouge et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:31-48 para una revisión). Los restos tanto α (1,3)-fucosilo como β (1,2)-xilosilo supuestamente son, al menos parcialmente, responsables de la inmunogenicidad de glucoproteínas vegetales en mamíferos (véase, por ejemplo, Ree et al. (2000) J Biol. Chem. 15:11451-11458; Bardor et al. (2003) Glycobiol. 13:427-434; García-Casado et al. (1996) Glycobiol. 6:471-477). Por lo tanto, la eliminación de estos restos de azúcar potencialmente alergénicos de glucoproteínas de mamífero producidas de forma recombinante en plantas superaría las cuestiones acerca del uso de estas proteínas como agentes farmacéuticos para el tratamiento de seres humanos.

Además, las plantas no contienen de forma natural una enzima β 1,4-galactosiltransferasa (GalT), que es responsable de la transferencia de Gal desde UDP-Gal a restos GlcNAc en glucanos *N*-ligados. El ADNc de GalT de mamífero se ha expresado de forma satisfactoria en células vegetales, produciendo *N*-glucanos parcialmente galactosilados similares a los anticuerpos producidos por células de hibridoma (Bakker et al. (2001) Proc Nat Acad Sci, USA 98:2899-2904). Por tanto, en una realización de la invención, pueden producirse anticuerpos que carecen de Gal en la estructura *N*-glucano. En otra realización, pueden producirse anticuerpos en células vegetales que contienen Gal en la estructura *N*-glucano.

Por consiguiente la presente invención proporciona métodos para producir un anticuerpo monoclonal recombinante, incluyendo un anticuerpo monoclonal que tiene función efectora mejorada, donde el anticuerpo se produce de forma recombinante en una planta que tiene un patrón de *N*-glucosilación alterado de glucoproteínas endógenas y heterólogas producidas en la misma de modo que estas glucoproteínas muestran una reducción en la cantidad de los restos xilosilo β 1,2-ligados específicos de plantas y/o restos fucosilo α 1,3-ligados unidos a los *N*-glucanos de la misma. Cuando los anticuerpos tienen cantidades reducidas de restos fucosilo α 1,3-ligados unidos a los *N*-glucanos de los mismos, los anticuerpos pueden tener actividad ADCC aumentada con relación a anticuerpos producidos en una planta de control que no se ha modificado genéticamente para inhibir la expresión o función de FucT.

Las plantas superiores transgénicas de la invención son capaces de producir un producto de glucoproteína que tiene un perfil sustancialmente homogéneo de glucosilación para la especie de glucano G0, y que está caracterizada por su homogeneidad sustancial para la glucoforma G0. La especie de glucano G0 también se menciona como especie de *N*-glucano "GnGn" o GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂. Esto produce de forma ventajosa sistemas de expresión en hospedadores vegetales que tienen una consistencia de producción aumentada, así como un riesgo químico, de fabricación y de control (CMC) reducido asociado con la producción de estas composiciones de glucoproteína. En una realización preferida, el producto de glucoproteína producido contiene al menos un 70% de una glucoforma homogénea. En otra realización preferida, el producto de glucoproteína producido contiene al menos un 80% que tiene una glucoforma homogénea. En otra realización preferida más, el producto de glucoproteína producido contiene al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% que tiene una glucoforma homogénea. En una realización, las composiciones de glucoproteína de la invención comprenden glucanos *N*-ligados que son predominantemente de la estructura de glucano G0. La glucoforma G0 de las composiciones de anticuerpo de la presente invención proporciona ventajosamente una composición de anticuerpo que tiene actividad ADCC aumentada en asociación con la ausencia de restos fucosilo. Además, la glucoforma G0 carece de los restos Gal terminales presentes en anticuerpos que tienen la glucoforma G2. Por tanto, estas composiciones de anticuerpos sustancialmente homogéneas de la invención que tienen predominantemente la glucoforma G0 tiene proporciones ADCC/CDC aumentadas.

Los métodos para alterar el patrón de *N*-glucosilación de proteínas en plantas superiores incluyen transformar de forma estable la planta con al menos una construcción recombinante de nucleótidos que proporciona la inhibición de la expresión de α 1,3-fucosiltransferasa (FucT) y β 1,2-xilosiltransferasa (XylT) en una planta. Los métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal son conocidos. La inhibición de la expresión de FucT o XylT, o ambas, puede obtenerse por varios métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, supresión anti-sentido, interferencia con ARN bicatenario (ARNds), interferencia con ARN horquilla (ARNhp) o interferencia con ARN horquilla que contiene intrones (ARNihp). Para interferencia con ARNds, se expresa una molécula de ARN con sentido como la descrita anteriormente para la co-supresión y una molécula ARN anti-sentido que es completa o parcialmente complementaria a la molécula de ARN con sentido en la misma célula, provocando la inhibición de la expresión del ARN mensajero endógeno correspondiente. Para interferencia con ARNhp, se diseña el casete de expresión para expresar una molécula de ARN que hibrida consigo misma, para formar una estructura de horquilla que comprende una región de bucle monocatenario y un tronco con apareamiento de bases. La región de tronco con apareamiento de bases comprende una secuencia con sentido correspondiente a todo o parte del ARN mensajero endógeno que codifica el gen cuya expresión tiene que inhibirse, y una secuencia anti-sentido que es completa o parcialmente complementaria a la secuencia con sentido. Por tanto, la región de tronco con apareamiento de bases de la molécula generalmente determina la especificidad de la interferencia con ARN. Las moléculas de ARNhp son altamente eficaces en la inhibición de la expresión de genes endógenos, y la interferencia con ARN que inducen es hereditaria por las posteriores generaciones de plantas. Véase, por ejemplo, Chuang y Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; y Waterhouse y Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38. Como alternativa, las plantas transgénicas de la invención que tienen la expresión de FucT y XylT silenciada del modo expuesto en este documento pueden modificarse adicionalmente en su maquinaria de glucosilación de modo que expresen una galactosiltransferasa y se unan de forma eficaz al resto de galactosa terminal en los *N*-glucanos de glucoproteínas endógenas y heterólogas producidas en las mismas.

Los protocolos de transformación así como los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula o nódulo vegetal, es decir, monocotiledonias o dicotiledonias, marcadas como diana para la transformación. Los métodos adecuados para introducir secuencias de nucleótidos en plantas o células o nódulos vegetales incluyen microinyección (Crossway et al. (1986) Biotechniques 4:320-334), electroporación (Riggs et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606), transformación mediada con *Agrobacterium* (patentes de Estados Unidos N° 5.563.055 y 5.981.840), transferencia génica directa (Paszowski et al. (1984) EMBO J. 3:2717-2722), aceleración de partículas balísticas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244; y 5.932.782; y Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," en Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlín); Mc-Cabe et al. (1988) Biotechnology 6:923-926). Las células que se han transformado pueden hacerse crecer en plantas de acuerdo con modos convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84.

Caracterización de la ausencia de restos fucosilo o xilosilo en anticuerpos anti-CD30

Los anticuerpos de la invención carecen de restos fucosilo y xilosilo, por ejemplo en la cadena carbohidrato de la parte Fc. Los anticuerpos pueden ensayarse para la ausencia de restos fucosilo o xilosilo usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tal como electroforesis capilar en APTS con fluorescencia inducida por láser. En resumen, los oligosacáridos N-ligados del anticuerpo anti-CD30 purificado pueden liberarse añadiendo el péptido *N*-glucanasa (Prozyme) e incubando durante una noche. Los carbohidratos se resuspenden y derivatizan con 8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato (APTS) en condiciones suaves de aminación reductora en las que se minimiza la desialilación y la pérdida de restos fucosilo o xilosilo. Los aductos de reacción se analizan por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducido por láser (Beckman Coulter). Puede observarse una ausencia de fucosilo o xilosilo por un cambio en la electroforesis en comparación con el mismo anticuerpo que contiene fucosilo o xilosilo. Otra técnica para ensayar la ausencia de fucosilo o xilosilo en anticuerpos anti-CD30 es un análisis de monosacáridos usando HPLC. Los ensayos adecuados para determinar la unión de CD30 se describen adicionalmente en los Ejemplos.

Caracterización de eliminación celular dependiente de anticuerpos de células CD30+

Los anticuerpos anti-CD30 pueden ensayarse para su capacidad de mediar la fagocitosis y eliminar células que expresan CD30. En una realización, un anticuerpo anti-CD30 defucosilado y desxilosilado potencia la eliminación de células que expresan CD30 en comparación con el mismo anticuerpo que contiene fucosilo y xilosilo cuando se comparan a la misma concentración. En otra realización, un anticuerpo anti-CD30 defucosilado y desxilosilado induce la eliminación de células que expresan CD30 mientras que el mismo anticuerpo que contiene fucosilo y xilosilo no induce eliminación celular a la misma concentración.

La actividad ADCC de un anticuerpo monoclonal puede ensayarse en ensayos *in vitro* establecidos. Como ejemplo, puede usarse un ensayo de ADCC de liberación de cromo. En resumen, pueden purificarse células mononucleares de sangre periférica (PBMC), u otras células efectoras, de donantes sanos por centrifugación en densidad de Ficoll Hypaque, seguido de lisis de los eritrocitos contaminantes. Las PBMC lavadas pueden suspenderse en RPMI

suplementado con suero de terminar fetal al 10% inactivado por calor y mezclarse con células que expresan CD30 marcadas con ^{51}Cr , a diversas proporciones de células efectoras a células tumorales (células efectoras:células tumorales). Después puede añadirse el anticuerpo anti-CD30 a diversas concentraciones. Puede usarse un anticuerpo de isotipo coincidente como control negativo. Los ensayos pueden realizarse durante 4-18 horas a 37°C. Las muestras pueden ensayarse para citólisis midiendo la liberación de ^{51}Cr en el sobrenadante de cultivo. El anticuerpo monoclonal anti-CD30 también puede ensayarse en combinaciones con otros para determinar si la citólisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Se ha demostrado que la función celular efectora mediada por el receptor Fc (FcR) es importante para la actividad *in vivo* de muchos mAb terapéuticos. El FcR expresado en células NK y macrófagos responsable de la actividad ADCC es FcγRIIIa. Se ha demostrado que la fagocitosis mediada por macrófagos es un mecanismo importante en la reducción de células B *in vivo* (Tedder et al. (2006) Springer Semin Immunol 28:351-64). Se ha demostrado previamente que la eliminación de los restos de fucosa de diversos mAb producidos en otros sistemas de expresión aumenta la unión de FcR y potencia la función ADCC. Por tanto, en una realización, los anticuerpos de la presente invención tienen una afinidad de unión aumentada por FcγRIIIa.

Un ensayo alternativo que puede usarse para ensayar la capacidad del anticuerpo anti-CD30 de mediar la fagocitosis y la eliminación de células que expresan CD30 es un ensayo fluorométrico resuelto en el tiempo. En resumen, las células que expresan CD30 se cargan con un acetoximetil éster de ligando potenciador de la fluorescencia (BATDA), que penetra en las membranas celulares. En el interior de la célula, los enlaces éster se hidrolizan y el compuesto ya no puede pasar por la membrana celular. Entonces puede añadirse el anticuerpo anti-CD30 a diversas concentraciones. Después de la citólisis, se añade una solución de europio (Perkin Elmer) y cualquier ligando libre se une al europio para formar un quelato altamente fluorescente y estable (EuTDA) que puede leerse en un lector de microplaca (Perkin Elmer). La señal medida se correlaciona con la cantidad de células lisadas.

Los anticuerpos anti-CD30 también pueden ensayarse en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones) para determinar su eficacia en la mediación de la fagocitosis y la eliminación de células que expresan CD30, por ejemplo, células tumorales. Estos anticuerpos pueden seleccionarse, por ejemplo, en base a los siguientes criterios, que no pretenden ser exclusivos:

- 1) unión a células vivas que expresan CD30;
- 2) elevada afinidad de unión a CD30;
- 3) unión a un epítipo único en CD30 (para eliminar la posibilidad de que anticuerpos monoclonales con actividades complementarias, cuando se usen en combinación, compitan por la unión al mismo epítipo);
- 4) opsonización de células que expresan CD30;
- 5) mediación *in vitro* de la inhibición del crecimiento, la fagocitosis y/o la eliminación de células que expresan CD30 en presencia de células efectoras humanas.

Los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención cumplen uno o más de estos criterios. En una realización particular, los anticuerpos monoclonales se usan en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CD30 o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, pueden combinarse anticuerpos monoclonales anti-CD30 que tienen diferentes actividades pero complementarias en una única terapia para conseguir un efecto terapéutico o de diagnóstico deseado. Una ilustración de esto sería una composición que contiene un anticuerpo monoclonal anti-CD30 que media la eliminación altamente eficaz de células diana en presencia de células efectoras, en combinación con otro anticuerpo monoclonal anti-CD30 que inhibe el merecimiento de células que expresan CD30.

Caracterización de la unión a CD30

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para la unión a CD30 por, por ejemplo, ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis FACS y/o análisis Biacore. En un ensayo ELISA típico, en resumen, se recubren placas de microtitulación con CD30 purificada a 0,25 µg/ml en PBS, y después se bloquean con albúmina sérica bovina al 5% en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos o reactivo policlonal de cabra específico anti-Fc de IgG humana) conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a OD de 405-650.

Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CD30, puede usarse citometría de flujo. En un ejemplo típico (pero no limitante) de un protocolo de citometría de flujo, se mezclan líneas celulares que expresan CD30 (cultivadas en condiciones de crecimiento convencionales) con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA al 0,1% y suero de ratón al 20%, y se incuban a 37°C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humana) en las mismas condiciones que la tinción con anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse por un instrumento FACScan usando propiedades de dispersión de la luz y lateral para

obtener acceso a células individuales. Puede usarse un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-CD30 pueden ensayarse adicionalmente para la reactividad con el antígeno CD30 por transferencia de Western. Por ejemplo, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan CD30 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ratón al 20%, y se sondan con los anticuerpos monoclonales a ensayar. La unión del anticuerpo puede detectarse usando anticuerpo secundario específico anti-especie unido a fosfatasa alcalina y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Se conocen en la técnica otras técnicas para evaluar la capacidad de unión de anticuerpos a CD30, incluyendo análisis RIA y Biacore. En los Ejemplos se describen en detalle ensayos adecuados para determinar la unión a CD30.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse adicionalmente por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-CD30. Pueden usarse diversos ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos en base a estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable de cadena ligera o pesada. La presencia de uno o más sitios de glucosilación en la región variable puede provocar inmunogenicidad aumentada del anticuerpo o una alteración de la pK del anticuerpo debido a la unión alterada al antígeno (Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al. (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro RG (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706). Se ha sabido que la glucosilación sucede en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glucosilación en la región variable puede ensayarse usando un ensayo de glucotransferencia, que escinde al anticuerpo para producir un Fab, y después ensaya la glucosilación usando un ensayo que mide la oxidación de peryodato y la formación de base de Schiff. Como alternativa, la glucosilación de la región variable puede ensayarse usando cromatografía de luz Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido de sacáridos individuales. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CD30 que no contenga glucosilación de la región variable. Esto puede conseguirse seleccionando anticuerpo que no contienen el motivo de glucosilación en la región variable o mutando los restos dentro del motivo de glucosilación usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomería de asparagina. Puede existir un efecto de desamidación o ácido isoaspártico en secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o ácido isoaspártico provoca la creación de ácido isoaspártico que disminuye la estabilidad de un anticuerpo creando una estructura curvada apartada en el extremo carboxi de la cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico puede medirse usando un ensayo isoquant, que usa HPLC en fase inversa para ensayar el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoelectrónico único (pI), pero generalmente los anticuerpos están en el intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 típicamente está dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 típicamente están en el intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que esté fuera de este intervalo. Aunque los efectos generalmente son desconocidos, existe la especulación de que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal puede tener algo de desplegamiento e inestabilidad en condiciones *in vivo*. El punto isoelectrónico puede ensayarse usando un ensayo de enfoque isoelectrónico capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar enfoque con láser para una precisión aumentada (Janini et al (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt et al (1998) J Chromatogr A 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CD30 que contenga un valor de pI que esté en el intervalo normal. Esto puede conseguirse seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o mutando restos superficiales cargados usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). Una mayor estabilidad térmica indica mayor estabilidad global del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse usando técnicas tales como calorimetría de exploración diferencial (Chen et al. (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) Immunol Lett 68:47-52). La T_{M1} indica la temperatura del desplegamiento inicial del anticuerpo. La T_{M2} indica la temperatura del desplegamiento completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que la T_{M1} de un anticuerpo de la presente invención sea mayor de 60°C, preferiblemente mayor de 65°C, incluso más preferiblemente mayor de 70°C. Como alternativa, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse usando difracción circular (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9).

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-CD30 puede medirse usando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, lo que es bien comprendido en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos mínimos de agregación. La agregación puede conducir a la activación de una respuesta inmune indeseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables con una agregación del 25% o menos, preferiblemente del 20% o menos, incluso más preferiblemente del 15% o menos, incluso más preferiblemente del 10% o menos e incluso más preferiblemente del 5% o menos. La agregación puede medirse por varias técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo columna de exclusión de tamaño (SEC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y dispersión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Anticuerpos anti-CD30 quiméricos o humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD30 de la invención es un anticuerpo quimérico o humanizado. Dichos anticuerpos pueden prepararse usando anticuerpos anti-CD30 de ratón que están disponibles en la técnica y procedimientos establecidos para convertir un anticuerpo de ratón en un anticuerpo quimérico o humanizado. Ejemplos no limitantes de dichos anticuerpos anti-CD30 de ratón incluyen los anticuerpos monoclonales AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 y Ber-H8. Además, se describen anticuerpo anti-CD30 humanizados en la publicación PCT WO 02/4661.

Anticuerpos que tienen secuencias particulares de la línea germinal

En una cierta realización, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de la línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de la línea germinal particular.

Por ejemplo, en una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_H 4-34, donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana. En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_H 3-07, donde el anticuerpo se une específicamente a CD30. En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_K L15, donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana. En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_K A27, donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana. En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_K L6, donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana.

En otra realización preferida más, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_H 4-34 o 3-07 (que codifica las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N° 25 y 26, respectivamente);

(b) comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se obtiene de un gen humano V_K L15, A27, o L6 (que codifica las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N° 27, 28, y 29, respectivamente); y

(c) se une específicamente a CD30 humana.

Una combinación preferida V_H y V_K de la línea germinal es V_H 4-34 y V_K L15. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 4-34 y V_K L15, respectivamente, es el anticuerpo 5F11. Otra combinación preferida de V_H y V_K de la línea germinal es V_H 3-07 y V_K A27. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 3-07 y V_K A27, respectivamente, es el anticuerpo 17G1. Otra combinación preferida de V_H y V_K de la línea germinal es V_H 4-34 y V_K L6. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 4-34 y V_K L6, respectivamente, es el anticuerpo 2H9.

Como se usa en este documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "se obtienen de" una secuencia particular de la línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina humana de la línea germinal. Dichos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o explorar una biblioteca génica de inmunoglobulina humana presentada en fagos, con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se obtiene de" una secuencia de inmunoglobulina humana

de la línea germinal puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas humanas de la línea germinal (por ejemplo, usando la base de datos Vbase) y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina humana de la línea germinal que es más cercana en secuencia (es decir, el % de identidad mayor) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se obtiene de" una secuencia de inmunoglobulina humana de la línea germinal particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o la introducción intencionada de mutaciones dirigidas al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina humana de la línea germinal y contiene restos aminoacídicos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias murinas de la línea germinal). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95%, o incluso al menos un 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano obtenido de una secuencia de la línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina humana de la línea germinal. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos homólogos

En otra realización más, un anticuerpo defucosilado de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en este documento, y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD30 de la invención.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

- (a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 1, 2, y 3;
- (b) la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 4, 5, y 6;
- y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen elevada (es decir, del 80% o mayor) homología con las regiones V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las SEC ID N° 1-6, seguido de ensayo del anticuerpo alterado codificado para la función retenida (es decir, la unión a CD30) usando los ensayos de unión descritos en este documento. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las SEC ID N° 1-6 se muestran en las SEC ID N° 30-35.

Como se usa en este documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = N° de posiciones idénticas/N° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta la cantidad de huecos, y la longitud de cada hueco, que tienen que introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, como se describe en los siguientes ejemplos no limitantes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz NWSgapdna.CMP y una carga por hueco de 40, 50, 60, 70, o 80 y una carga por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de carga PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una carga por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una carga por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de carga PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización

por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una carga por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una carga por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Además o como alternativa, las secuencias proteicas de la presente invención pueden usarse adicionalmente como "secuencia consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas en BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, valor = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase, www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

En ciertas realizaciones, un anticuerpo defucosilado de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde una o más de estas secuencias CDR comprenden secuencias específicas de aminoácidos basadas en los anticuerpos preferidos descritos en este documento (por ejemplo, 5F11, 17G1, y 2H9), o modificaciones conservativas de los mismos, y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD30 de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal defucosilado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, donde:

- (a) la secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9, 12, o 15, y modificaciones conservativas de la misma;
- (b) la secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18, 21 ó 24, y modificaciones conservativas de la misma; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a CD30 humana.

En una realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8, 11, o 14, y modificaciones conservativas de la misma; y la secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 17, 20, o 23, y modificaciones conservativas de la misma. En otra realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7, 10, o 13, y modificaciones conservativas de la misma; y la secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16, 19, o 22, y modificaciones conservativas de la misma.

Como se usa en este documento, la expresión "modificaciones conservativas de secuencia" pretende hacer referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de la invención por técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas en las que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, puede reemplazarse uno o más restos aminoacídicos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención con otros restos aminoacídicos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede ensayarse para la función retenida (es decir, las funciones expuestas en (c) anterior) usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones de forma aleatoria a lo largo de todo o parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-CD30, tal como por mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-CD30 modificados resultantes pueden explorarse para la actividad de unión.

Anticuerpos que se unen al mismo epítoto que anticuerpos anti-CD30 de la invención

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos defucosilados que se unen al mismo epítoto que los diversos anticuerpos anti-CD30 de la invención proporcionados en este documento, tales como otros anticuerpos humanos que se unen al mismo epítoto que los anticuerpos 5F11, 17G1 ó 2H9 descritos en este documento. Dichos anticuerpos adicionales pueden identificarse en base a su capacidad de competir de forma cruzada (por ejemplo, de inhibir competitivamente la unión, de un modo estadísticamente significativo) con otros anticuerpos de la invención, tales como 5F11, 17G1 ó 2H9, en ensayos de unión a CD30 convencionales. La capacidad de un anticuerpo de ensayo de inhibir la unión de, por ejemplo, 5F11, 17G1 ó 2H9 a CD30 humana demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con ese anticuerpo por la unión a CD30 humana; dicho anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítoto o un relacionado (por ejemplo, un estructuralmente similar o espacialmente proximal) en CD30 humana que el anticuerpos con el que compete. En una realización preferida, el anticuerpo defucosilado que se une al mismo epítoto en CD30 humana que 5F11, 17G1 o 2H9 es un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en la publicación PCT WO 03/059282.

Anticuerpos diseñados y modificados

Un anticuerpo defucosilado de la invención puede prepararse adicionalmente usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en este documento como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, pudiendo dicho anticuerpo modificado tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse modificando uno o más restos aminoacídicos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones flanqueantes. Además o como alternativa, un anticuerpo puede diseñarse modificando los restos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de región variable que puede realizarse es injerto de CDR. Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de restos aminoacídicos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDR. Como las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias CDR del anticuerpo de origen natural específico injertadas en secuencias flanqueantes de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; patente de Estados Unidos Nº 5.225.539 de Winter, y patentes de Estados Unidos Nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal defucosilado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID Nº 7, 8, y 9, las SEC ID Nº 10, 11, y 12, y las SEC ID Nº 13, 14, y 15, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID Nº 16, 17, y 18, las SEC ID Nº 19, 20, y 21 y las SEC ID Nº 22, 23, y 24, respectivamente. Por tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias CDR V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1 ó 2H9 pero pueden contener diferentes secuencias flanqueantes de estos anticuerpos.

Dichas secuencias flanqueantes pueden obtenerse de bases de datos públicas de ADN o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, pueden encontrarse secuencias de ADN de la línea germinal para genes humanos de la región variable de cadena pesada y ligera en la base de datos de secuencias humanas de la línea germinal "VBase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH Nº 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germline VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes humanos de la región variable de cadena pesada y ligera pueden encontrarse en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la línea germinal de cadena pesada encontradas en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles en los adjuntos números de acceso a Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias de la línea germinal de cadena pesada encontradas en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles en los adjuntos números de acceso a Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NG_0010109 y NT_024637), 4-34 (NG_0010109 y NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias proteicas de anticuerpo se comparan frente a una base de datos compilada de secuencias proteicas usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia llamado Gapped BLAST (Altschul et al. (1997)

Nucleic Acids Research 25: 3389-3402) que es bien conocido para los especialistas en la técnica. BLAST es un algoritmo heurístico en el que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la base de datos tiene probabilidad de contener pares de segmentos de alta valoración (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyos valores no pueden mejorarse por extensión o recorte se llaman un *hit*. En resumen, las secuencias de nucleótidos de origen en VBASE (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php) se traducen y se retiene la región entre e incluyendo la región flanqueante FR1 a FR3. Las secuencias de base de datos tienen una longitud promedio de 98 restos. Se eliminan las secuencias duplicadas que son coincidencias exactas sobre la longitud completa de la proteína. Una búsqueda en BLAST para proteínas usando el programa blastp con parámetros patrón por defecto excepto el filtro de baja complejidad, que se desactiva, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra un máximo de 5 hits que producen coincidencias de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen en las seis fases y la fase sin codones de parada en el segmento coincidente de la secuencia de la base de datos se considera el hit potencial. Esto se confirma a su vez usando el programa de BLAST tblastx, que traduce la secuencia del anticuerpo en las seis fases y compara esas traducciones con las secuencias de nucleótidos de VBASE traducidas dinámicamente en las seis fases.

Las identidades son coincidencias exactas de aminoácidos entre la secuencia del anticuerpo y la base de datos de proteínas sobre la longitud completa de la secuencia. Los positivos (identidades + coincidencia de sustitución) no son idénticos sino sustituciones de aminoácidos guiadas por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia del anticuerpo coincide con dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, se decidiría que el hit con la mayoría de positivos sería el hit de secuencia coincidente.

Las secuencias flanqueantes preferidas para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias flanqueantes usadas por anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias V_H 4-34 o 3-07 (SEC ID N° 25 ó 26) y/o la secuencia flanqueante V_K L15, A27 o L6 (SEC ID N° 27, 28, o 29) usada por anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias V_H CDR1, 2 y 3, y las secuencias V_K CDR1, 2 y 3, pueden injertarse en regiones flanqueantes que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del cual deriva la secuencia flanqueante, o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones flanqueantes que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en ciertos casos es beneficioso mutar restos dentro de las regiones flanqueantes para mantener o potenciar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al).

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar restos aminoacídicos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_K para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la mutación o mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en este documento y se proporciona en los Ejemplos. Se introducen preferiblemente modificaciones conservativas (como se ha analizado anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales defucosilados anti-CD30, o partes de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región V_H CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 7, 8, y 9, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 7, 8, y 9; (b) una región V_H CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 10, 11, y 12, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 10, 11, y 12; (c) una región V_H CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 13, 14, y 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 13, 14, y 15; (d) una región V_K CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 16, 17 y 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 16, 17, y 18; (e) una región V_K CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 19, 20, y 21, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 19, 20, y 21; y (f) una región V_K CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 22, 23, y 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 22, 23, y 24.

Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos en los que las modificaciones se han hecho en restos flanqueantes dentro de V_H y/o V_K , por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones flanqueantes se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más restos flanqueantes en la secuencia correspondiente de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener restos flanqueantes que difieren de la secuencia de la línea germinal de la cual se obtiene el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse comparando las secuencias flanqueantes del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las cuales se obtiene el anticuerpo. Por ejemplo, para 5F11, el resto aminoacídico N° 83 (dentro de FR3) de V_H es una asparagina mientras que este resto en la secuencia correspondiente de la línea germinal V_H 4-34 es una serina. Para devolver las secuencias de la región flanqueante a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" en su secuencia de la línea germinal por, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, el resto 83 de FR3 de la V_H de 5F11 puede "retromutarse" de asparagina a serina. Dichos anticuerpos "retromutados" también pretenden estar incluidos por la invención.

Otro tipo de modificación de la región flanqueante implica mutar uno o más restos dentro de la región flanqueante, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para retirar epítopes de células T para reducir de este modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se menciona como "desinmunización" y se describe en mayor detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030153043 de Carr et al.

Además o como alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones flanqueantes o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, puede unirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe a continuación en mayor detalle. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal modo que se altere el número de restos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, se aumente o disminuya. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 5.677.425 de Bodmer et al. La cantidad de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introduce una o más mutaciones de aminoácidos en la región de contacto del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de modo que el anticuerpo tenga unión alterada a la proteína A de estafilococos (SpA) relativa a la unión a SpA del dominio nativo Fc-bisagra. Este enfoque se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos N° 6.165.745 de Ward et al.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, puede introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate obtenido de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto aminoacídico con un resto aminoacídico diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, puede reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos aminoacídicos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 con un resto aminoacídico diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero que retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efectos para el cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe en mayor detalle en las patentes de Estados Unidos N° 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En otro ejemplo, puede reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos aminoacídicos 329, 331 y 322 con un resto aminoacídico diferente de modo que el anticuerpo tenga unión alterada a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Este enfoque se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551 de Idusogie et al.

En otro ejemplo, se altera uno o más restos aminoacídicos en las posiciones de los aminoácidos 231 y 239 para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ

modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase, Shields, R.L et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 han demostrado mejorar la unión a Fc γ RIII. Además, los siguientes mutantes de combinación demostraron mejorar la unión a Fc γ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

Otra modificación de los anticuerpos de este documento que se contempla por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede pegarse para, por ejemplo, aumentar la vida media biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG llegan a quedar unidos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se realiza mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se usa en este documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se haya usado para derivatizar otras proteínas, tal como monoalcoxi (C1-C10)- o ariloalcoxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura et al. y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Métodos para diseñar anticuerpos

Como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos defucosilados anti-CD-30 que tienen secuencias V_H y V_K descritas en este documento pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-CD30 modificando las secuencias V_H y/o V_K, o la región o regiones constantes unidas a las mismas. Por tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo anti-CD30 de la invención, por ejemplo 5F11, 17G1, o 2H9, se usan para crear anticuerpos defucosilados anti-CD-30 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como unión a CD30 humana. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 5F11, 17G1 ó 2H9, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse de forma recombinante con regiones flanqueantes conocidos y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-CD30 adicionales diseñados de forma recombinante de la invención, como se ha analizado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección previa. El material de partida para el método de diseño es una o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. En su lugar, se usa la información contenida en la secuencia o secuencias como material de partida para crear una secuencia o secuencias de "segunda generación" derivadas de la secuencia o secuencias originales y después se prepara y expresa la secuencia o secuencias de "segunda generación" como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CD30 que comprende:

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 7, 8, y 9, una secuencia CDR2 seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 10, 11, y 12 y/o una secuencia CDR3 seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 13, 14, y 15; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 16, 17, y 18, una secuencia CDR2 seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 19, 20, y 21 y/o una secuencia CDR3 seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 22, 23, y 24;
- (b) alterar al menos un resto aminoacídico dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia del anticuerpo alterado. La secuencia del anticuerpo alterado preparada de este modo después puede hacerse en forma defucosilada usando los métodos descritos en este documento para obtener un anticuerpo alterado defucosilado anti-CD30.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse usando ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en este documento, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión, ensayos de ADCC).

En ciertas realizaciones de los métodos para diseñar anticuerpos de la invención, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente o de forma selectiva a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-CD30 y los anticuerpos modificados anti-CD30 pueden explorarse para la actividad de unión y/u otras propiedades funciones descritas en este documento. Los métodos de mutación se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y explorar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis por saturación, ensamblaje por ligamiento sintético, o una combinación de los mismos. Como alternativa, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar et al. describe métodos para usar métodos informáticos de exploración para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en este documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN monocatenario. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se ha vuelto sustancialmente puro" cuando está purificado de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, unión con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe a continuación en detalle), pueden obtenerse ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo creado por el hibridoma por amplificación convencional por PCR o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca génica de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son aquellas que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1, y 2H9. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 5F11 se muestra en la SEC ID N° 30. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 5F11 se muestra en la SEC ID N° 33. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 17G1 se muestra en la SEC ID N° 31. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 17G1 se muestra en la SEC ID N° 34. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 2H9 se muestra en la SEC ID N° 32. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 2H9 se muestra en la SEC ID N° 35.

Una vez se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, se une de forma funcional un fragmento de ADN que codifica VL o VH a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido de forma funcional", como se usa en este contexto, pretende indicar que los dos fragmentos de ADN están unidos de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniéndolo de forma funcional el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por amplificación convencional por PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede unirse de forma funcional a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) uniéndolo de forma funcional el ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por amplificación convencional por

PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen de forma funcional a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena sencilla continua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque a menudo están en secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), de ADNc, genómico o mezclas de los mismos, pueden mutarse de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de secuencias nativas V, D, J, constantes, de cambio y otras de estas secuencias descritas en este documento (donde "derivada" indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

Producción de anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente invención pueden producirse por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la técnica protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma murino de interés y diseñarse para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una región flanqueante humana usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.225.539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.). Se conoce una diversidad de anticuerpos de ratón anti-CD30 en la técnica que pueden usarse para crear anticuerpos anti-CD30 quiméricos o humanizados, por ejemplo, AC 10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, y Ber-H8.

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD30 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcrómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcrómicos incluyen ratones mencionados en este documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se mencionan colectivamente en este documento como "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran expresión reducida de IgM de ratón o κ , y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgG κ monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse

adicionalmente, las patentes de Estados Unidos N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados Unidos N° 5.545.807 de Surani et al.; las publicaciones PCT N° WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT N° WO 01/14424 de Korman et al.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden crearse usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, mencionados en este documento como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Aún más, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para crear anticuerpos anti-CD30 de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo mencionado como Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para crear anticuerpos anti-CD30 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, mencionados como "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, se han descrito vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana en la técnica (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y pueden usarse para crear anticuerpos anti-CD30 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando métodos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las patentes de Estados Unidos N° 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; las patentes de Estados Unidos N° 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; las patentes de Estados Unidos N° 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y las patentes de Estados Unidos N° 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos después de inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.476.996 y 5.698.767 de o Wilson et al. Immunization of Human Ig Mice.

Cuando se usan ratones de Ig humana para crear anticuerpos humanos de la invención, dichos ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD30 y/o CD30 recombinante, o una proteína de fusión de CD30, como se describe por Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851; y la publicación PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) de antígeno CD30 para inmunizar por vía intraperitoneal los ratones de Ig humana.

Se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra CD30 en la publicación PCT WO 03/059282. La experiencia acumulativa con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, se ha descubierto que también son eficaces otros adyuvantes diferentes del de Freund. Además, se ha descubierto que células completas en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede controlarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras plasmáticas que se obtienen por exanguinaciones retroorbitales. El plasma puede explorarse por ELISA (como se describe a continuación), y pueden usarse los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-CD30 para las fusiones. Los ratones pueden recibir refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la retirada del bazo. Se espera que pueda necesitarse realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Típicamente se inmunizan entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Habitualmente se usan las cepas tanto HCo7 como HCo 12. Además, pueden propagarse los transgenes tanto HCo7 como HCo12 juntos en un único ratón que tiene dos transgenes diferentes de cadena pesada humana (HCo7/HCo12).

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglio linfático de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden explorarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de célula única

de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con una sexta parte de la cantidad de células de mieloma de ratón no secretante P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Como alternativa, la suspensión de célula única de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados puede fusionarse usando un campo eléctrico basado en el método de electrofusión, usando una máquina de electroporación de fusión celular con cámara grande CytoPulse (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Mariland). Las células se siembran en placa a aproximadamente 2×10^5 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero Clone fetal al 20%, medio condicionado "653" al 18%, origen (IGEN) al 5%, L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en que el HAT se ha remplazado con HT. Los pocillos Individuales entonces pueden explorarse por ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez ha sucedido el crecimiento del hibridoma extensivo, el medio puede observarse habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden volver a sembrarse en placa, explorarse de nuevo, y si siguen siendo positivos para IgG humana, pueden subclonarse los anticuerpos monoclonales al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables después pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces rotativos de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse a PBS, y la concentración puede determinarse por OD280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Pueden formarse alícuotas de los anticuerpos monoclonales y almacenarse a -80°C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales de a invención

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula hospedadora usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica bien conocidos (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, por técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación con ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de modo que los genes estén unidos de forma funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido de forma funcional" pretende indicar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector tienen su función pretendida de regulación de la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores diferentes o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector, o ligamiento por extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en este documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera del isotipo deseado de modo que el segmento V_H se una de forma funcional al segmento o segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_K se una de forma funcional al segmento C_L dentro del vector. Además o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde la célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido en fase al extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los especialistas en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos virales que dirigen elevados niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40),

adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y poliovirus. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la β -globina. Adicionalmente, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor $SR\alpha$, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se introducen por transfección en una célula hospedadora por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, es más preferible la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y mucho más preferiblemente células hospedadoras de mamífero, porque dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha informado que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Las células hospedadoras preferidas para expresar anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células que modifican la fucosilación de un anticuerpo expresado. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de modo que la célula hospedadora produce proteínas que carecen de fucosilo en sus carbohidratos, o una célula hospedadora que expresa glucosil transferasas de modificación de glucoproteínas de modo que los anticuerpos expresados en la célula hospedadora tienen un aumento de estructuras GlcNAc de bisección que evita la fucosilación. Otras células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasm, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

Otros hospedadores preferidos para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células que modifican la fucosilación y la xilosilación de un anticuerpo expresado. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula vegetal que carece de una enzima fucosiltransferasa y xilosiltransferasa de modo que la célula hospedadora produce proteínas que carecen de fucosilo y xilosilo en sus carbohidratos. Los métodos para alterar el patrón de *N*-glucosilación de proteínas en plantas superiores incluyen transformación estable de la planta con al menos una construcción recombinante de nucleótidos que proporciona la inhibición de la expresión de α 1,3-fucosiltransferasa (FucT) y β 1,2-xilosiltransferasa (XylT) en una planta. Los métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal son conocidos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos que se unen a diferentes epítopes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo

desfucosilado anti-CD30 de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-neoplásico, anti-inflamatorio o inmunosupresor. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, fármacos anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos (NSAID), por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, tales como ibuprofeno (Motrin, Advilo), naproxeno (Naprosyn), sulindaco (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro), indometacina (Indocin), y aspirina en elevadas dosis. Otros ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación se describen en la continuación en mayor detalle en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo o inmunocombinado, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-sustituídos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalino-térreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula deseado en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, *supra*, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de

las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado en vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se esté tratando, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención está dictaminada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo defucosilado anti-CD30 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, dándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunas realizaciones, se administran de forma simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo habitualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales puede ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique por la medición de los niveles sanguíneos de anticuerpo contra el antígeno diana en el paciente. En algunas realizaciones, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración plasmática de anticuerpo de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse en forma de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente elevada a intervalos relativamente cortos, hasta que se reduce o interrumpe el progreso de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. Después de ello, al paciente puede administrársele un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para conseguir la

respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-CD30 de la invención preferiblemente provoca una disminución en la gravedad de los síntomas de enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de enfermedad, o una prevención de la deficiencia o discapacidad debida a la aflicción patológica. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores cancerosos, una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferiblemente inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente el 60%, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente el 80% con relación a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de inhibir, siendo dicha inhibición *in vitro*, por ensayos conocidos para los especialistas en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Los especialistas en la técnica serán capaces de determinar dichas cantidades en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los especialistas en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías preferidas de administración para anticuerpos de la invención incluyen las vías intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en este documento significa modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Como alternativa, un anticuerpo defucosilado de la invención puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o a la mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioctoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, puede administrarse una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes de Estados Unidos N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente invención incluyen: la patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación de una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos N° 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos N° 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de Estados Unidos N° 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; la patente de Estados Unidos N° 4.439.196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármaco que tienen compartimentos multi-cámara; y la patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármaco. Muchos otros de dichos implantes, sistemas de suministro, y módulos son conocidos para los especialistas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos defucosilados de la invención pueden formularse para asegurar la apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hemato-encefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófobos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las

patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, potenciado de este modo el suministro dirigido del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Restos ejemplares de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos, composiciones de anticuerpo y métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos que implican la expresión de CD30. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una diversidad de trastornos. Como se usa en este documento, el término "sujeto" pretende incluir seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, pollos, aves, anfibios, y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos caracterizados por la expresión de CD30. Cuando los anticuerpos contra CD30 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente.

Pueden usarse otros anticuerpos en combinación con anticuerpos anti-CD30 de la presente invención para producir un efecto aditivo o sinérgico. Estos incluyen moléculas sobre la superficie de células dendríticas que activan la función DC y la presentación de antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir de forma eficaz la actividad de célula T auxiliar (Ridge, J. et al. (1998) Nature 393: 474-478) y pueden usarse junto con anticuerpos CD30. La activación de anticuerpos para moléculas co-estimuladoras de células T tales como CTLA-4 (por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.811.097), OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997), e ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) Nature 397: 262-266) también puede proporcionar niveles aumentados de activación de células T.

Las vías adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo o inmunoconjugado) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden seleccionarse los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

En una realización, los anticuerpos de la invención pueden ensayarse inicialmente para la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse usando ELISA y ensayos citométricos de flujo. Además, puede ensayarse la actividad de estas moléculas en la activación de al menos una actividad celular efectora mediada por efector, incluyendo la inhibición del crecimiento de y/o la eliminación de células que expresan CD30. A continuación en los Ejemplos se describen protocolos para ensayar la ADCC mediada por células efectoras.

A. Métodos de detección

En una realización, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar los niveles de CD30, o los niveles de células que contienen CD30 en su superficie de membrana, niveles que después pueden ligarse a ciertos síntomas de enfermedad.

En una realización particular, la invención proporciona métodos para detectar la presencia del antígeno CD30 en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno CD30, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CD30, en condiciones para permitir la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y CD30. Entonces se detecta la formación de un complejo, donde una diferencia en la formación de complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia del antígeno CD30 en la muestra. Por ejemplo, pueden realizarse métodos de detección convencionales, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y ensayos citométricos de flujo, usando las composiciones de la invención.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona adicionalmente métodos para detectar la presencia de CD30 (por ejemplo, antígeno CD30 humano) en una muestra, o para medir la cantidad de CD30, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CD30, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte de unión del mismo y CD30. Entonces se detecta la formación de un complejo, donde una

diferencia en la formación de complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de CD30 en la muestra.

Las composiciones de la invención también pueden usarse para marcar como diana células que expresan CD30, por ejemplo, para marcar dichas células. Para dicho uso, el agente de unión puede ligarse a una molécula que puede detectarse. Por tanto, la invención proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CD30. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor enzimático.

B. Inhibición del crecimiento de células CD30+

Los anticuerpos pueden usarse para inhibir o bloquear la función CD30 que, a su vez, puede ligarse a la prevención o mejora de ciertos síntomas de enfermedad, implicando de este modo a CD30 como involucrada en la enfermedad. Pueden determinarse diferencias en la expresión de CD30 durante una patología en comparación con un estado no patológico poniendo en contacto una muestra de ensayo de un sujeto que padece la enfermedad y una muestra de control con el anticuerpo anti-CD30 en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD30. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y CD30 se detecta y compara en la muestra y el control.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para provocar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento de y/o eliminar una célula que expresa CD30; mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CD30 en presencia de células efectoras humanas; inhibir el desprendimiento de CD30 soluble, bloquear la unión de ligando de CD30 a CD30, inhibir la expresión de IL-4 o mediar la expresión del fenotipo Th2, por ejemplo, a bajas dosificaciones. Como se analiza en este documento, los anticuerpos defucosilados de la invención muestran actividad ADCC potenciada en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células CD30⁺ que comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo defucosilado anti-CD30 en condiciones suficientes para inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de dichas células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

En una realización, los anticuerpos, o partes de unión de los mismos, de la presente invención pueden usarse para modular los niveles de CD30 en células diana, tal como limitando y eliminando los receptores en la superficie celular. También pueden usarse mezclas de anticuerpos anti-receptor Fc para este propósito.

También pueden usarse células efectoras específicas de diana, por ejemplo, células efectoras unidas a composiciones de la invención como agentes terapéuticos. Las células efectoras para direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células eliminadoras naturales y otras células que albergan receptor de IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto a tratar. Las células efectoras específicas de diana pueden administrarse en forma de una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. La cantidad de células administrada puede ser del orden de 10⁸-10⁹ pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CD30, y para realizar la eliminación celular por, por ejemplo, fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de diana puede realizarse junto con otras técnicas para la eliminación de células marcadas como diana. Por ejemplo, puede usarse terapia anti-tumoral usando las composiciones de la invención y/o células efectoras dotadas con estas composiciones junto con quimioterapia. Además, puede usarse inmunoterapia de combinación para dirigir dos diferentes poblaciones efectoras citotóxicas hacia el rechazo de células tumorales.

C. Uso de inmunoconjugados y terapia de combinación

En una realización, pueden usarse inmunoconjugados de la invención para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular CD30 ligando dichos compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, puede conjugarse un anticuerpo anti-CD30 con cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las patentes de Estados Unidos N° 6.281.354 y 6.548.530, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20030050331, 20030064984, 20030073852, y 20040087497, publicados en los documentos WO 03/022806, WO05/112919 o descritos en [la solicitud de patente de Estados Unidos correspondiente al expediente del mandatario de Darby & Darby LLP N° 0203496-WOO, presentado el 7 de abril de 2006]. Por tanto, la invención también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CD30 (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor enzimático). Como alternativa, los inmunoconjugados pueden usarse para eliminar células que tienen receptores de superficie celular CD30 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas a CD30, tal como a células tumorales que expresan CD30 para eliminar de este modo la célula tumoral, o a células presentadoras de antígeno que expresan CD30 para eliminar de este modo las APC como un medio para inhibir respuestas inmunes (por ejemplo, en trastornos autoinmunes).

En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de Fey o receptores Fey, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas para su administración durante el tratamiento incluyen factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), y factor de necrosis tumoral (TNF).

En otra realización, el sujeto puede tratarse adicionalmente con una preparación de linfoquina. Las células cancerosas que no expresan CD30 de forma elevada pueden inducirse a hacerlo usando preparaciones de linfoquina. Las preparaciones de linfoquina pueden causar una expresión más homogénea de CD30 entre las células de un tumor lo que puede conducir a una terapia más eficaz. Las preparaciones de linfoquina adecuadas para su administración incluyen interferón-gamma, factor de necrosis tumoral, y combinaciones de los mismos. Éstas pueden administrarse por vía intravenosa. Las dosificaciones adecuadas de linfoquina son de 10.000 a 1.000.000 unidades/paciente.

En otra realización, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpo de la invención se les puede administrar adicionalmente (antes de, simultáneamente con, o después de la administración de un anticuerpo de la invención) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos, u otro anticuerpo. El anticuerpo puede ligarse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o de forma concurrente con el agente o puede co-administrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cáncer, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, y ciclofosfamida hidroxilurea que, por sí mismos, son solamente eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de los anticuerpos anti-CD30, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anti-cáncer que funcionan mediante mecanismos diferentes que producen un efecto citotóxico en células tumorales humanas. Dicha co-administración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumores que las volvería no reactivas con el anticuerpo.

D. Tratamiento de enfermedades autoinmunes

Las composiciones pueden usarse *in vitro* o *in vivo* para tratar enfermedades mediadas por o que implican CD30, por ejemplo, enfermedades caracterizadas por la expresión, típicamente sobre-expresión, de CD30 tales como enfermedades autoinmunes mediadas por macrófagos, neutrófilos activados, células dendríticas o células NK, tales como enfermedades autoinmunes tiroideas, tales como enfermedad de Graves y tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmune y esclerosis múltiple (Ruggeri et al. (2006) *Histol Histol-pathol.* 21:249-56; Chiarle et al. (2003) *Pathologica* 95:229-30; Chakrabarty et al. (2003) *Clin Exp Immunol* 133:318-225; Watanabe et al. (2003) *Thyroid* 13:259-63; Pellegrini et al. (2005) *Neuroimmunomodulation* 12:220-34). La CD30 soluble se desprende regularmente de la superficie de células que expresan CD30 y se ha informado de elevados niveles de sCD30 en el suero de pacientes con una diversidad de trastornos tumorigénicos y autoinmunes. Por consiguiente, otro uso más para los anticuerpos de la invención incluye la prevención o tratamiento de enfermedades que implica el bloqueo o inhibición del desprendimiento de sCD30.

Poniendo en contacto el anticuerpo con CD30 (por ejemplo, administrando el anticuerpo a un sujeto), se inhibe la capacidad de CD30 de inducir dichas actividades y, por tanto, se trata el trastorno asociado. La composición de anticuerpo puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un inmunosupresor que actúa junto con o sinérgicamente con la composición de anticuerpo para tratar o prevenir la enfermedad mediada por CD30. Los anticuerpos preferidos se unen a epitopes que son específicos de CD30 y, por tanto, inhiben ventajosamente las actividades inducidas por CD30, pero no interfieren con la actividad de antígenos de superficie estructuralmente relacionados. Las composiciones pueden usarse para tratar cualquier enfermedad mediada por células que expresan CD30 incluyendo, aunque sin limitación, anemia hemolítica autoinmune (AIHA), artritis reumatoide (RA), lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis sistémica, dermatitis atópica, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegner, síndrome de Omen, fallo renal crónico, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD; incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca), diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), mononucleosis infecciosa aguda, VIH, enfermedades asociadas a herpesvirus, esclerosis múltiple (MS), rechazo de trasplantes, alergia o enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), anemia hemolítica, tiroiditis, síndrome del hombre rígido, pénfigo vulgar y miastenia grave (MG).

E. Tratamiento del cáncer

En otra realización, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento células tumorales CD30+ (es decir, células tumorales que expresan CD30) en un sujeto, en el que se administra un anticuerpo defucosilado anti-CD30 de la invención al sujeto de modo que se inhibe el crecimiento de las células tumorales

CD30+. Para sujetos humanos, el anticuerpo preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano. En una realización preferida, las células tumorales son células tumorales de enfermedad de Hodgkin. En otra realización preferida, las células tumorales son células tumorales de linfomas de células grandes anaplásicas (ALCL). En otras realizaciones, las células tumorales puede ser de una enfermedad seleccionada entre el grupo compuesto por linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfomas cutáneos de células T, linfomas de células escondidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T en el adulto (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas de células grandes difusas de linaje B, linfoma de células T tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfoma de células T en el adulto (ATL), linfomas basados en cavidad corporal asociados a VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas indiferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi y otros linfomas de células T CD30+ y linfomas de células B CD30+.

El método implica administrar a un sujeto una composición de anticuerpo de la presente invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpo puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico que actúa junto con o sinérgicamente con la composición de anticuerpo para tratar o prevenir la enfermedad asociada con la expresión de CD30.

Kits

También están dentro del alcance de la invención kits que comprenden un anticuerpo de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunoestimulador, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítopo en el antígeno CD30 distinto del primer anticuerpo). Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que acompañe de otro modo al kit.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación y caracterización de anticuerpo monoclonal desfucosilado anti-CD30

En este ejemplo, se expresó un anticuerpo monoclonal anti-CD30 completamente humano en una línea celular que carece de una enzima fucosilo transferasa de modo que la línea celular produce proteínas que carece de fucosilo en sus carbohidratos. El anticuerpo desfucosilado se ensayo frente a un anticuerpo fucosilado anti-CD30 (expresado en una línea celular diferente que contiene la enzima fucosilo transferasa) para determinar las diferencias estructurales y características entre los anticuerpos, usando una diversidad de técnicas de análisis químico, incluyendo electroforesis capilar, comparación de secuencias de aminoácidos, diferencias de masas por espectroscopía de masas y variación de carga por enfoque isoeléctrico capilar.

El anticuerpo monoclonal completamente humano anti-CD30 5F11 se describió originalmente en la publicación PCT WO 03/059282. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la cadena pesada de 5F11 se muestran en la Figura 1A y las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la cadena ligera de SF11 se muestran en la Figura 1B. Las secuencias variables de cadena pesada y ligera de 5F11 se subclonaron en un vector de expresión. El ADNc de región variable kappa de 5F11, que incluye su secuencia señal y una secuencia Kozak óptima, se subclonó en fase con la región constante kappa human. El ADNc de la región variable de cadena pesada de 5F11, que incluye su secuencia señal y una secuencia Kozak óptima, se subclonó en fase con la región constante pesada γ 1 humana. La expresión tanto de la cadena ligera como de la pesada, estuvo dirigida por promotores de ubiquitina C humana (Nenoi, M. et al. Gene 175; 179, 1996). Este vector de expresión se describe en mayor detalle en la publicación de patente de Estados Unidos US 2005 153394.

El vector de expresión se introdujo por transfección en la línea de célula hospedadora FUT8^{-/-} Ms704 por electroporación de ADN. La línea celular FUT8^{-/-} Ms704 se creó por la alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de remplazo, y se describe más completamente en la publicación de patente de Estados Unidos 20040110704 de Yamane et al. y Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22. Las células Ms704 se adaptaron al crecimiento en cultivo en suspensión en medio de crecimiento, medio EX-CELL™ 325 PF CHO (JRH N° 14335) suplementado con hipoxantina 100 μ M con timidina 16 μ M (Invitrogen N° 11067-030) y L-glutamina 6 mM (Invitrogen N° 25030-081).

El ADN del vector a usar para electroporación se precipitó con etanol y se resuspendió en Tris 7,6 10 mM, EDTA 1 mM. Se utilizaron 1, 5, 10, 15 o 20 μ g de ADN para veinte electroporaciones, cuatro electroporaciones por concentración de ADN. Las células Ms704 se prepararon por transfección lavando las células en una solución tamponada con sacarosa (SBS) y resuspendiendo las células a 1×10^7 células/ml de solución SBS. Se mezclaron 400 μ l de células con el ADN de la construcción y se sometieron a electroporación utilizando ajustes a 230 voltios,

400 microfaradays de capacitancia y 13 ohms de resistencia (BTX Molecular Delivery Systems N° 600 electromanipulador celular). Las células se retiraron de las cubetas de electroporación y se añadieron 20 ml de medio de crecimiento. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos usando 200 µl de células por pocillo, aproximadamente 4×10^4 células/pocillo. A los 2 días después de la electroporación, se retiraron 150 µl del medio de cada pocillo y se remplazaron con 150 µl de medio de selección, medio de crecimiento con 400 µg/ml de G418 (Invitrogen N° 10131-035). Cada tres a siete días, se remplazaron 150 µl de medio de selección por pocillo con medio de selección fresco. Las células hospedadoras CHO DG44 (FUT 8^{+/+}) se sometieron a electroporación con la construcción 5F11 idéntica usando un procedimiento similar y se establecieron los transfectantes CHO DG44 que expresaban anticuerpo recombinante 5F11 que contenía carbohidratos fucosilados.

Los clones Ms704 y CHO DG44 de mayor producción se expandieron y se purificó el anticuerpo 5F11 recombinante de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad de proteína A.

Se hizo un análisis comparativo de oligosacáridos N-ligados derivados de las muestras de anticuerpo monoclonal anti-CD30 derivado de Ms704 y CHO DG44 por fluorescencia inducida por láser de electroforesis capilar (cLIF) (Chen y Evangelista (1998) *Electrophoresis* 15:1892). Los oligosacáridos N-ligados del anticuerpo purificado se liberaron añadiendo el péptido N-glucanasa (Prozyme) e incubando durante una noche. La proteína se precipitó con etanol, y el sobrenadante que contenía carbohidrato se transfirió a un nuevo tubo y se secó usando un Speedvac. Los carbohidratos se resuspendieron y derivatizaron con 8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato (APTS) en condiciones suaves de aminación reductora en las que se minimizó la desialilación y la pérdida de restos fucosilo. Los aductos de reacción se analizaron por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducido por láser (Beckman Coulter) (Ma y Nashabeh (1999) *Anal. Chem.* 71:5185). Se observaron diferencias en el perfil de oligosacáridos entre el anticuerpo obtenido de la línea celular Ms704 en comparación con la línea celular CHO DG44, coherente con una ausencia de restos fucosilo en los anticuerpos anti-CD30 derivados de Ms704.

Para confirmar la ausencia de restos fucosilo en el anticuerpo expresado en células Ms704, se realizó el análisis de la composición de monosacáridos. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1: Análisis de monosacáridos

Anticuerpo	Cantidad de proteína (µg)	Monosacárido	Cantidad encontrada (pmol)	mol de azúcar/mol de proteína
Anti-CD30 + fucosilo	29 µg	Fucosilo	206,0	1,0
		Galactosamina	0,0	0,0
		Glucosamina	847,6	4,4
		Galactosa	85,8	0,5
		Manosa	547,0	2,9
Anti-CD30 - fucosilo	23 µg	Fucosilo	0,0	0,0
		Galactosamina	0,0	0,0
		Glucosamina	655,2	4,3
		Galactosa	89,7	0,6
		Manosa	488,8	3,2

Los resultados del análisis de monosacáridos confirman que la actividad expresada en células Ms704 carece de restos fucosilo.

A parte de la diferencia en los oligosacáridos mostrada por electroforesis capilar y análisis de monosacáridos, las muestras proteicas de anticuerpo anti-CD30 derivado de Ms704 y CHO DG44 fueron esencialmente idénticas. El análisis de la secuencia proteica N-terminal reveló una secuencia de aminoácidos N-terminal idéntica. La espectroscopía de masas de la cadena ligera de los anticuerpos anti-CD30 derivados de Ms704 y CHO DG44 produjo masas de 23,740 y 23,742, respectivamente, que estuvieron dentro del error del instrumento. Los dos anticuerpos también se ensayaron usando un ensayo de kit convencional de enfoque isoelectrico capilar (Beckman Coulter) y mostró que las dos muestras de anticuerpo tuvieron un punto isoelectrico idéntico a 8,6. Estos estudios indican que el componente proteico de las muestras de anticuerpo derivadas de las células Ms704 y CHO DG44 son esencialmente idéntico con la excepción de la defucosilación del componente carbohidrato de los anticuerpos derivados de Ms704.

Ejemplo 2: evaluación de la actividad ADCC de anticuerpo defucosilado anti-CD30

El anticuerpo monoclonal anti-CD30 5F11 es capaz de eliminar células CD30+ a través del reclutamiento de una población de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En este ejemplo, se ensayaron anticuerpos monoclonales defucosilados 5F11 (defuc-5F11) para la capacidad de eliminar líneas celulares CD30+ en presencia de células efectoras en un ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo.

Se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre completa del siguiente modo. Se purificaron células mononuclear de sangre periférica humana a partir de sangre completa heparinizada por separación convencional

con Ficoll-paque. Las células se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante una noche a 37°C. El siguiente día, se recogieron las células y se lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a 1×10^7 células/ml. Se incubaron dos millones de células CD30+ diana con 200 μCi de ^{51}Cr en 1 ml de volumen total durante 1 hora a 37°C. Las células diana se lavaron una vez, se resuspendieron en 1 ml de medio, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación final, las células diana se lavaron una vez y se llevaron a un volumen a final de 1×10^5 células/ml.

Las líneas celulares CD30+ L540 (linfoma de Hodgkin humano; depósito DSMZ N° ACC 72), L428 (linfoma de Hodgkin humano; depósito DSMZ N° ACC 197), L1236 (linfoma de Hodgkin humano; depósito DSMZ N° ACC 530) y Karpas (linfoma de células T humanas; depósito DSMZ N° ACC 31) se ensayaron inicialmente para la unión tanto a 5F11 fucosilado (fuc-5F11) como a defuc-5F11 usando una análisis FACS convencional. Cada célula diana presentó perfiles de unión similares a través de un intervalo de concentraciones de anticuerpo tanto para fuc-5F11 como para defuc-SF11. El nivel de expresión de CD30, determinado por intensidad de fluorescencia media, fue el mayor en L540, seguido de Karpas, L428, y la expresión más baja de CD30 fue en células L1236.

Las células L540, L428, L1236 y Karpas se ensayaron en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) con ^{51}Cr modificado del siguiente modo. Cada línea celular diana (100 μl de células CD30+ marcadas) se incubó con 50 μl de células efectoras y 50 μl de anticuerpo. Se usó una proporción diana a efecto de 1:50 en todos los experimentos. En todos los estudios, también se procesaron los siguientes controles negativos: a) células diana y efectoras sin anticuerpo, b) células diana sin células efectoras, c) pocillos que contenían células diana y efectoras en presencia de Triton X-100 al 1%, y d) un control de isotipo de IgG1 humana. Después de una incubación de 4 horas a 37°C, se recogieron los sobrenadantes y se contaron en un contador gamma (Cobra II autogamma de Packard Instruments) con una ventana de lectura de 240-400 keV. Los recuentos por minuto se representaron como una función de la concentración de anticuerpo y los datos se analizaron por regresión no lineal, de respuesta a dosis sigmoideo (pendiente variable) usando el software Prism (San Diego, CA). Las curvas de citotoxicidad celular para las líneas celulares L540, L428, L1236 y Karpas usando concentraciones variables de fuc-SF1 y defuc-5F11 se muestran en las Figuras 4-7, respectivamente.

El porcentaje de lisis se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de lisis} = (\text{CPM de la muestra} - \text{CPM sin anticuerpo}) / (\text{CPM TritonX} - \text{CPM sin anticuerpo}) \times 100$$

El % de lisis se ensayó a una concentración de anticuerpo de 25 $\mu\text{g/ml}$ y una proporción de célula diana a efectora de 1:50. También se calcularon los valores de EC_{50} para cada célula diana. Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Capacidad citotóxica de anticuerpo monoclonal desfucosilado anti-CD30

Célula diana	% de lisis	% de lisis	% de lisis	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} proporción
	Fucosilo +	Fucosilo -	proporción fucosilo -: fucosilo +	Fucosilo +	Fucosilo -	fucosilo+: fucosilo-
L540	42	68	1,61	0,042	0,009	4,7
Karpas	19	50	2,63	0,250	0,032	7,8
L428	20	43	2,15	0,100	0,009	11,1
L1236	4	13	3,25	1,218	0,045	27,1

Defuc-5F11 mostró de 1,61 veces (para células L540) a 3,25 veces (para células L1236) mayor porcentaje de lisis celular en comparación con el anticuerpo fuc-5F11. Esta potencia aumentada del defuc-5F11 produce una lisis celular medible a concentraciones de anticuerpo donde el fuc-SF11 no tiene efecto medible. Por ejemplo, en células L1236, que tienen un bajo nivel de expresión de CD30, defuc-5F11 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ produce una lisis específica del 10%, mientras que fuc-5F11 a la misma concentración no tiene efecto medible (véase la Figura 6). Defuc-5F11 fue de 4,7 veces (para células L540) a 27,1 veces (para células L1236) más potente en actividad ADCC que el anticuerpo fuc-SF11, medida por la proporción de valores de EC_{50} .

Ejemplo 3: Evaluación de la actividad ADCC de anticuerpo anti-CD30

En este ejemplo, se ensayaron anticuerpos monoclonales anti-CD30 para la capacidad de eliminar líneas celulares CD30+ en presencia de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en un ensayo de citotoxicidad con fluorescencia. Se prepararon células efectoras humanas como se ha descrito anteriormente y el ensayo de ADCC se realizó como se ha indicado anteriormente. Como puede observarse en la Figura 9, cuando se usa el anticuerpo desfucosilado anti-CD30 hubo actividad ADCC aumentada como comparación con el anticuerpo precursor anti-CD30. Además, el anticuerpo desfucosilado anti-CD30 fue más potente que el anticuerpo precursor como se evidencia por la EC_{50} reducida en comparación con el anticuerpo precursor anti-CD30. El anticuerpo también fue más eficaz como se evidencia por el hecho de que el porcentaje máximo de lisis fue mayor para el anticuerpo desfucosilado anti-CD30. Con cualquier anticuerpo, el

anticuerpo anti-CD16 (3G8) inhibió de forma eficaz la ADCC, lo que sugiere que esta lisis estaba mediada por CD16.

Ejemplo 4: ADCC aumentada con células efectoras humanas.

Se realizaron ensayos de ADCC como se ha descrito anteriormente. En este experimento, sin embargo, se compararon células efectoras de ratón con células efectoras humanas. Como puede observarse en la Figura 10, aunque no hubo ADCC aumentada en la comparación del anticuerpo precursor anti-CD30 con el anticuerpo defucosilado cuando se usaron células efectoras de ratón, cuando se examinaron células efectoras humanas, hubo un aumento notable en la ADCC con el anticuerpo defucosilado en comparación con el anticuerpo precursor anti-CD30.

Ejemplo 5: Ensayo de ADCC que compara anticuerpo precursor y defucosilado usando células efectoras de monos cynomolgus

Se obtuvo sangre completa de monos cynomolgus. Los glóbulos rojos de las células de sangre periférica de mono cynomolgus lisada se estimularon con 50 U/ml de rIL-2 y se cultivaron en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% durante una noche a 37°C. En el día del estudio, las células de mono cynomolgus se resuspendieron en tampón de ensayo (RPMI1640, FBS al 10%, probenecid 2,5 mM) a 1×10^7 células/ml. Las células diana CD30 positivas, Karpas 299, se marcaron, se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, probenecid 2,5 mM, HEPES 20 mM), y se ajustaron a 1×10^5 células/ml para una proporción de célula diana a efectora de 1:50. El ensayo de ADCC se realizó como se ha descrito anteriormente. Comparamos la actividad del anticuerpo precursor anti-CD30 con el anticuerpo defucosilado usando células efectoras purificadas de sangre de mono cynomolgus. Se observó una actividad ADCC moderada con el anticuerpo precursor (de aproximadamente el 7-10% de lisis celular a 10 µg/ml). En contraste, el anticuerpo defucosilado indujo un porcentaje de lisis significativamente mayor (de aproximadamente el 10-30% de lisis celular a 10 µg/ml) y una EC50 reducida (véase la Figura 11).

Ejemplo 6: Análisis de Scatchard de la afinidad de unión de anticuerpos monoclonales anti-CD30 a células L540, células de sangre periférica activadas humanas y de mono cynomolgus

Se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos precursor y defucosilado anti-CD-30. Comparamos la afinidad de unión de los dos anticuerpos a células L540 CD30 positivas así como células mononucleares de sangre periférica humana o de mono cynomolgus activadas con PHA/Con A.

Las células de sangre periférica humana o de mono cynomolgus se estimularon con 2 µg/ml de PHA, 10 µg/ml de Con A, y 50 U/ml de rIL-2 y se cultivaron en medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% a una densidad de 1×10^6 células/ml durante 3 días. En el día del estudio, las células se lavaron y se ajustaron a 2×10^7 células/ml en tampón de unión (RPMI1640 +FBS al 10%). Como control, se usaron células L540 CD30 positivas (ajustadas a $4-8 \times 10^6$ células/ml) en estos estudios ya que expresan elevados niveles de antígeno. Las células se pusieron en hielo hasta el inicio del experimento. Se recubrieron placas de filtro de fibra de vidrio Millipore (MAFBN0B50) con leche en polvo desnatada al 1% en agua y se almacenaron a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de unión. Se añadieron cincuenta microlitros de tampón solo a los pocillos de unión máxima (unión total). Se añadieron veinticinco microlitros de tampón solo a los pocillos de control. Se añadió una concentración variable de 125 I-anticuerpo anti-CD30 a todos los pocillos en un volumen de 25 µl. Se añadieron concentraciones variables de anticuerpo no marcado a un exceso de factor 300-400 en un volumen de 25 µl a pocillos de control (unión no específica) y se añadieron 25 µl de células L540 CD30 positivas o células de sangre periférica humana o de mono cynomolgus estimuladas en tampón de unión a todos los pocillos. Las placas se incubaron durante 2 horas a 200 RPM en un agitador a 4°C. Al completarse la incubación, las placas Millipore se lavaron dos veces con 0,2 ml de tampón de lavado cole (RPMI1640, FBS al 10%, NaCl 500 mM). Los filtros se retiraron y se contaron en un contador gamma. La evaluación de la unión en equilibrio se realizó usando parámetros de unión de un único sitio con el software Prism (San Diego, CA).

Usando el ensayo de unión de Scatchard anterior, la K_D del anticuerpo precursor CD30 para células L540 fue de aproximadamente 1,4 nM mientras que el anticuerpo defucosilado tuvo una K_D de 1,9 nM (Tabla 3). Esto indica que hubo poco cambio en la afinidad con la eliminación del fucosilo. Estos estudios se repitieron usando células primarias en lugar de una línea celular. Además, se ensayó la afinidad sobre células que expresan significativamente menos receptores por célula. Se prepararon células de sangre periférica humana activadas como se ha indicado anteriormente y se descubrió que la K_D era de 1,1 y 2,7 nM para el anticuerpo precursor y defucosilado anti-CD30, respectivamente.

Finalmente, se comparó la afinidad de unión del anticuerpo precursor y defucosilado a células mononucleares de sangre periférica de mono cynomolgus activadas con PHA, Con A, y rIL-2. Se descubrió que la K_D era de aproximadamente 0,47 nM y 0,83 nM para el anticuerpo precursor y defucosilado, respectivamente.

Tabla 3 Análisis de Scatchard

Muestra		L540	Humana	Cynomolgus
CD30 precursor	KD (nM prom.)	1,37	1,08	0,47
	Receptores por célula (prom.)	2496082	45654	72781
CD30 defucosilado	KD (nM prom.)	1,93	2,66	0,83
	Receptores por célula (prom.)	3024600	74258	108824

Ejemplo 7: Producción de anticuerpo monoclonal anti-CD30 que tiene unión al receptor mejorada y actividad ADCC aumentada

Este ejemplo perfila la expresión de mAb humanos anti-CD30 en *Lemna*. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos anti-CD30 se describieron originalmente en la publicación PCT WO 03/059282, que se incorpora por la presente por referencia. La optimización de la glucosilación del mAb anti-CD30 se consiguió por co-expresión con una construcción de ARNi que dirige la expresión endógena de los genes de α -1,3-fucosiltransferasa (FucT) y β -1,2-xilosiltransferasa (XylT) de un modo similar al indicado en los ejemplos anteriores para mAb1. El mAb anti-CD30 resultante producido en *Lemna* que tiene su maquinaria de glucosilación diseñada para suprimir la expresión de FucT y XylT contenía una única especie principal de *N*-glucano sin ninguna traza de *N*-glucanos específicos de plantas. Además de la homogeneidad del *N*-glucano, los mAb anti-CD30 gluco-optimizados también demostraron tener citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y actividad de unión al receptor de células efectoras potenciadas en comparación con mAb anti-CD30 expresados en CHO.

MÉTODOS

Cepas y reactivos.

Se usaron células de *Escherichia coli* competentes de Novablu para todos el trabajo de ADN recombinante (EMD Biosciences, San Diego, CA). Las endonucleasas de restricción y las enzimas de modificación del ADN se obtuvieron de New England Biolabs (Ipswich, MA). Los oligonucleótidos se obtuvieron de Integrated DNA technologies (Coralville, IA). Las columnas Waters Oasis HLB y MCX (1 cc), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), y ácido α -ciano-4-hidroxycinnámico (CHCA) fueron de Waters Corporation (Milford, MA). Los aceptores de *N*-glucano GnGn, de tetrapéptido dabsilado purificado (GnGn-dabsil-péptido) y la *N*-glucosidasa A fueron de EMD Biosciences. Las columnas Carbowgraph SPE (4 cc) fueron de Grace Davidson Discovery Sciences (Deerfield, IL). El uridina-5'-difosfo-D-xilosilo (UDP-Xyl) se adquirió de Carbosource Services (Athens, GA). El acetonitrilo (Optima grade) fue de Fisher Scientific (Summerville, NY). El acetato de amonio fue de MP Biochemicals (Irvine, CA). Los maltooligosacáridos (MD6-1) fueron de V-Labs Inc. (Covington, CA). Los patrones de monosacárido fueron de Dionex (Sunnyvale, CA). El BATDA (bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato) y la solución de europio fueron de Perkin-Elmer (Wellesley, MA). El guanosina-5'-difosfo-L-fucosilo (GDP-Fuc), la N-acetilglucosamina (GlcNAc), el ácido 2-aminobenzoico (2-AA) y todos los demás materiales fueron de Sigma (St. Louis, MO).

Construcción de mAb y vectores de expresión de ARNi.

Se determinaron las secuencias de ADNc de región variable de cadena pesada (H) y ligera (L) del anticuerpo kappa mAb1 completamente humano 5F11 obtenido de un Medarex HuMAb-Mouse® transgénico y se produjo el anticuerpo mAb humano 5F11 de longitud completa de forma recombinante por una línea celular de ovario de hámster chino, CHO DG44, usando técnicas convencionales. Los genes optimizados para las cadenas H y L se diseñaron para que tuvieran uso de codones preferidos por *Lemna* (63%-67% de contenido en GC) y contienen la secuencia señal α -amilasa del arroz (GenBank M24286) fusionada al extremo 5' de sus secuencias codificantes. Se añadieron sitios de endonucleasas de restricción para clonación en vectores binarios de *Agrobacterium* (EcoRI (5') / Sad (3'), cadena H) y (Sall (5') / HindIII (3'), cadena L). Se construyeron genes sintéticos y se proporcionaron por Picoscript (Houston, TX).

Se diseñó un ARN en horquilla quimérico para dirigir el silenciamiento de genes endógenos de *Lemna* que codifican la α -1,3-fucosiltransferasa (en base a la secuencia codificante de *L. minor* FucT isoforma N° 1, véase GenBank DQ789145) y la β -1,2-xilosiltransferasa (en base a la secuencia codificante de *L. minor* XylT isoforma N° 2, véase GenBank DQ789146). El ARN en horquilla quimérico FucT + XylT se diseñó para que tuviera 602 pb de secuencia FucT bicatenaria, 626 pb de secuencia XylT bicatenaria, y 500 pb de secuencia espaciadora. La parte de hebra con sentido del casete de ARN en horquilla abarca el fragmento directo FucT y el fragmento directo XylT, una secuencia espaciadora. La parte de hebra antisentido del ARN en horquilla abarca el fragmento inverso XylT y el fragmento inverso FucT. El ARN en horquilla quimérico se construyó amplificando por PCR los fragmentos génicos directo e inverso FucT y XylT del ADNc de *Lemna minor* y clonándolos secuencialmente en pT7blue (EMD Biosciences) creando el plásmido XF02 en T7-4. El fragmento génico directo FucT se amplificó con los cebadores de ADN BLX 686 (5'-ATGGTCTGACTGCTGCTGGTCTCTCAAC-3') (SEC ID N° 36) y BLX690 (5'-ATGTCTAGAATG CAGCAGCAAGTGCACC-3') (SEC ID N° 37) que producen un producto de 620 pb con sitios de clonación terminales

Sall (5') y XbaI (3'). El fragmento génico directo XylT se amplificó con los cebadores de ADN BLX 700 (5'-ATGACTAGTTGCGAAGCCTACTTCGGCAACAGC3') (SEC ID N° 38) y BLX694 (5'-ATGGGATCCGAATCTCAAGAACAAGTGTGCG-3') (SEC ID N° 39) que producen un producto de 1144 pb con sitios de clonación terminales SpeI (5') y BamHI (3'). El fragmento génico inverso XylT se amplificó con los cebadores de ADN BLX 695 (5'-ATGGGTACCTGCGAAGCCTACTTCGGCAACAGC-3') (SEC ID N° 40) y BLX696 (5'-ATGGGATCCACTGGCTGGGAGAAGTTCTT-3') (SEC ID N° 41) que producen un producto de 644 pb con sitios de clonación terminales BamHI (5') y KpnI (3'). El fragmento génico inverso FucT se amplificó con los cebadores de ADN BLX 691 (5'-ATGGAGCTCTGCTGCTGGTGTCTCAAC-3') (SEC ID N° 42) y BLX692 (5'-ATGGGTACCATGCA GCAGCAAGTGCACC-3') (SEC ID N° 43) que producen un producto de 620 pb con sitios de clonación terminales KpnI (5') y SacI (3').

Se crearon casetes de expresión independientes que contenían un promotor, gen de interés, y terminador Nos para las cadenas 5F11 H y L optimizadas y el ARNi quimérico. Los casetes de expresión se clonaron en una modificación del vector binario de *Agrobacterium* pBMSP3 (obtenido del Dr. Stan Gelvin, Purdue University) con los sitios de restricción apropiados. La cadena H se fusionó con el promotor quimérico modificado de la octopina y manopina sintasa con líder³⁶ 5' de RbcS de *Lemna gibba*. La cadena L se fusionó con el promotor de alta expresión constitutivo de la poliubiquitina de *Lemna minor* (LmUbq). El casete quimérico de ARNi, obtenido del plásmido XF02 en T7-4, se fusionó al promotor de alta expresión constitutivo de la poliubiquitina de *Spirodela polirhiza* (SpUbq). Los tres casetes de expresión se clonaron en el vector binario modificado pBMSP3 en orientación en tándem creando el plásmido MDXA04.

Transformación y exploración de líneas de plantas.

Usando *Agrobacterium tumefaciens* CS8Z707, se generaron plantas transgénicas que representan líneas clonales individuales a partir de nódulos de rápido crecimiento de *Lemna minor* de acuerdo con el procedimiento de Yamamoto *et al.* Para exploración transgénica, se preconditionaron líneas clonales individuales durante 1 semana a 150 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ en recipientes ventilados de cultivo de plantas que contenían medio SH sin sacarosa. Después se colocaron de quince a veinte frondas preconditionadas en recipientes ventilados que contenían medio SH fresco, y se dejaron crecer durante dos semanas. Se congelaron y almacenaron a -70°C muestras tisulares y de medio de cada línea.

Análisis ELISA de mAb producido en *Lemna*.

Se homogeneizó tejido de *Lemna* (100 mg) usando un molino de bolas FastPrep FP120 (Thermo Electron Corporation). Los sobrenadantes se diluyeron a 1 $\mu\text{g/ml}$ y se ensayaron usando el kit ELISA de cualificación de IgG (Bethyl Laboratories). Para el ensayo, las placas de microtitulación se recubrieron con anticuerpo de cabra anti-IgG humana a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, y el mAb se detectó por anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) diluido 1:100,000. Se crearon curvas patrón con IgG de referencia humana suministrada con el kit ELISA. La sensibilidad del ELISA fue de 7,8 ng/ml. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Preparación de membranas microsómicas de *Lemna* y ensayo de las actividades núcleo β -1,2-xilosiltransferasa y α -1,3-fucosiltransferasa.

Se homogeneizó tejido de *Lemna* (100 mg) de cada línea en 1 ml de tampón de homogenización frío (ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperazinaetanosulfónico [HEPES] 50 mM, pH 7,5, sacarosa 0,25 M, ácido etilendiaminatetraacético [EDTA] 2 mM, 1,4-ditiotretol [DTT] 1 mM) durante 40 s en un molino de bolas FastPrep FP120 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). El homogeneizado se centrifugó a 1.000 g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante se retiró y se centrifugó a 18.000 g durante 90 min. a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en 20 μl de tampón de reacción frío (ácido 2-[4-morfolino]etanosulfónico [Mes] 0,1 M, pH 7,0, Triton X-100 al 0,1% [v/v], MnCl_2 10 mM) y se mantuvo en hielo o se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las actividades núcleo β -1,2-xilosiltransferasa y α -1,3-fucosiltransferasa se midieron simultáneamente en 4 μl de membranas microsómicas preparadas de cada línea de ARNi incubando con GlcNAc 125 mM, UDP-Xyl 6,25 mM, GDP-Fuc 6,25 mM, MnCl_2 12,5 mM, y 1,5 nmol de aceptor de GnGn-dabsil-péptido durante 2 h a 37°C como se ha descrito previamente. La reacción se interrumpió por una breve centrifugación e incubación a 4°C y los productos se analizaron por MS MALDI-TOF en modo reflectrón positivo.

Purificación de mAb 5F11 LEX y LFX^{opt}.

Se homogeneizó tejido vegetal con fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 0,3 M, y EDTA 10 mM, pH 7,2 usando una mezcladora de alta cizalla Silverson. El homogeneizado se acidificó a pH 4,5 con ácido cítrico 1 M, y se centrifugó a 7.500 g durante 30 min. a 4°C. El pH del sobrenadante se ajustó a pH 7,2 con Tris 2 M, antes de la filtración usando filtros de 0,22 μm . El material se cargó directamente en resina de proteína A mAbSelect SuRe (GE Healthcare) equilibrada con una solución que contenían fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 0,3 M, y EDTA 10 mM, pH 7,2.

Después de la carga, la columna se lavó hasta la línea de base con el tampón de equilibrado seguido de un lavado intermedio con 5 volúmenes de columna de acetato sódico 0,1 M, pH 5,0. El anticuerpo unido se eluyó con 10 volúmenes de columna de acetato sódico 0,1 M, pH 3,0. El eluato de proteína A se neutralizó inmediatamente con 2-amino-2-[hidroximetil]-1,3-propanodiol (Tris) 2 M. Para la eliminación de agregados, el eluato de proteína A se ajustó a pH 5,5 y se aplicó a una columna de hidroxiapatita tipo I cerámica (Bio-Rad) equilibrada con fosfato sódico 25 mM, pH 5,5. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, el anticuerpo se eluyó en una elución de una única etapa usando fosfato sódico 0,25 M, pH 5,5. Las fracciones que contenían anticuerpo por A_{280} se combinaron y almacenaron a -80°C .

Se prepararon muestras de extracto tisular y muestras a través de flujo de proteína A para SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras por la adición de 2x tampón de muestra de SDS $\pm$ 2-mercaptoetanol al 5% [v/v]. Las muestras de eluato de proteína A y eluato de hidroxiapatita se diluyeron a una concentración de proteína de 0,5 mg/ml seguido de la adición de 2x tampón de muestra de SDS $\pm$ 2-mercaptoetanol al 5% [v/v]. Las muestras se incubaron a 95°C durante 2 minutos antes de la electroforesis usando geles con gradiente de Tris-Glicina al 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se incluyeron marcadores de peso molecular Mark12 (Invitrogen) y un patrón de referencia 5F11 en los geles. Los geles se tiñeron con tinte azul coloidal.

Purificación de glucanos N-ligados.

Se dializaron anticuerpos monoclonales purificados por proteína A (1 mg) de líneas de planta *Lemna* tipo silvestre y ARNi extensivamente frente a agua y se liofilizaron a sequedad. Las muestras se resuspendieron en 100 μl de ácido fórmico 5% (v/v), se llevaron a 0,05 mg/ml de pepsina, y se incubaron a 37°C durante una noche. Las muestras se inactivaron por calor a 95°C durante 15 min. y se secaron. Las digestiones con pepsina se resuspendieron en 100 μl de acetato sódico 100 mM, pH 5,0 y se incubaron con 1 mU de *N*-glucosidasa A a 37°C durante una noche. Los *N*-glucanos liberados se aislaron usando columnas Carbohydrate SPE de 4 cc y se secaron.

Los *N*-glucanos secados se purificaron adicionalmente usando cartuchos Waters Oasis MCX de 1 cc. Las columnas se prepararon lavando con 3 volúmenes de columna de metanol seguido de 3 volúmenes de columna de ácido fórmico 5% (v/v). Los *N*-glucanos, resuspendidos en 1 ml de ácido fórmico al 5% (v/v), se cargaron en las columnas preparadas. La fracción no unida así como 2 lavados adicionales con volumen de columna de ácido fórmico al 5% (v/v) se recogieron, combinaron, y se secaron.

Derivatización de oligosacáridos con ácido 2-aminobenzoico (2-AA).

Los *N*-glucanos o maltooligosacáridos purificados se marcaron con 2-AA y se purificaron usando cartuchos Waters Oasis HLB de 1 cc de acuerdo con Anumula y Dhume, 1998⁵⁰. Los *N*-glucanos y maltooligosacáridos marcados se resuspendieron en 50 μl de agua y se analizaron por MS MALDI-TOF en modo negativo y MS NP-HPLC-QTOF.

Espectrometría de masas MALDI-TOF.

La MS MALDI-TOF se realizó usando un Waters MALDI Micro MX (Millford, MA). El análisis de productos de reacción de β -1,2-xilosiltransferasa/ α -1,3-fucosiltransferasa se realizó mezclando 0,5 μl de cada sobrenadante de reacción con 0,5 μl de 10 mg/ml de CHCA en TFA al 0,05% (v/v), acetonitrilo al 50% (v/v) sobre una placa diana. Los productos GnGn-dabsil-péptido xilosilado ($[M+H]^+ = 2192,85$ Da) o fucosilado ($[M+H]^+ = 2206,87$ Da) se detectaron en modo reflectrón positivo. Los recuentos de iones de 200 espectros combinados de cada muestra se normalizaron frente a los de GnGn-dabsil-péptido β -1,4-galactosilado ($[M+H]^+ = 2222,87$ Da) presente como contaminante (<5%) en la mezcla original de GnGn-dabsil-péptido de EMD Biosciences.

Los *N*-glucanos o maltooligosacáridos marcados con 2-AA (0,5 μl) se diluyeron con agua, se mezclaron con 0,5 μl de 10 mg/ml de matriz DHB en acetonitrilo al 70% (v/v), se aplicaron puntualmente sobre una placa diana y se analizaron en modo reflectrón negativo.

Análisis MS NP-HPLC-Q-TOF de N-glucanos marcados con 2-AA.

N-glucanos o maltooligosacáridos marcados con 2-AA se llevaron a acetonitrilo al 80% (v/v) y se separaron en un sistema HPLC Waters 2695 equipado con una columna TSK-Gel Amide-80 (2 mm x 25 cm, 5 μm) (Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA). Los carbohidratos marcados con 2-AA se detectaron y analizaron usando un detector de fluorescencia Waters 2475 (excitación a 230 nm, emisión a 425 nm) y un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) Waters Q-TOF API US equipado en línea con el sistema HPLC.

Las separaciones se realizaron a 0,2 ml/min, 40°C , usando acetato amónico 10 mM, pH 7,3 (disolvente A) y acetato amónico 10 mM, pH 7,3, acetonitrilo al 80% (v/v) (disolvente B). La elución de la muestra se realizó a 0% de A isocrático durante 5 min., seguido de un aumento lineal a 10% de A a 8 min., y un aumento lineal a 30% de A a 48 min. La columna se lavó con A al 100% durante 15 min. y se equilibró a A al 0% durante 15 min. antes de la siguiente inyección.

El análisis QTOF se realizó en modo iónico negativo con temperaturas de fuente y desolvatación de 100°C y 300°C, respectivamente, y voltajes de capilar y cono de 2.100 y 30 V, respectivamente. Los espectros de masas mostrados son el resultado de combinar >40 exploraciones individuales por *N*-glucano marcado.

5 *Análisis de monosacáridos por HPAEC-PAD.*

Las muestras de mAb (200 µg) se sometieron a hidrólisis ácida usando TFA 2 N a 100°C durante 3 h. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío a temperatura ambiente y se reconstituyeron en 150 µl de agua antes del análisis por HPAEC-PAD (Dionex). Se aplicó una alícuota (25 µl) de la muestra reconstituida a una columna CarboPac PA10 (4 x 250 mm) con una pre-columna Amino Trap (Dionex). La separación de monosacáridos se consiguió con una fase móvil de KOH 3,5 mM, usando un generador de eluyente EG40. La identidad del pico de monosacárido y la abundancia relativa se determinaron usando patrones de monosacáridos.

15 *Estabilidad térmica de mAb.*

Se usó un instrumento de calorimetría de exploración diferencial (DSC) MicroCal (Northampton, MA) VP-Capilar para determinar la estabilidad térmica de mAb gluco-optimizados y de tipo silvestre. Las muestras de mAb purificadas se dializaron en NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl (PBS) 150 mM durante una noche. Los datos de desnaturalización térmica se recogieron calentando las muestras a una concentración de 300 µg/ml de 35 a 95°C a una velocidad de exploración de 1°C/min usando PBS como tampón de referencia. La retroalimentación y la ganancia se establecieron en bajo. Los datos corregidos a la medida inicial y normalizados se ajustaron a un modelo no de 2 estados usando el software Origin v7.0.

25 *Actividad de unión a FcR de mAb.*

El experimento se realizó usando un instrumento BIACORE (Biacore AB, Uppsala, Suecia) usando tecnología de resonancia de plasmón superficial. Los mAb, 2 µg/ml, se capturaron en una superficie recubierta con antígeno (CD30 humana recombinante). Se hicieron fluir varias concentraciones de ambos alotipos Val¹⁵⁸ y Phe¹⁵⁸ de FcRγIIIa, partiendo de 6 µM, sobre los anticuerpos capturados durante 3 min. La señal de unión como función de FcRγIIIa se ajustó a un modelo de unión de un sitio usando el software GraphPad Prism (v4.01) para obtener los valores de K_D. Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y P20 al 0,005% (v/v) a pH 7,4) en todo el experimento. La unión de los mAb al tampón o FcRγIIIa a superficies vacías se usaron como controles negativos.

35 *Ensayo para la afinidad de unión a antígeno.*

Se usaron células L540 que expresan CD30 (DSMZ Cell Culture Collection N° ACC 72) como células positivas a antígeno para ensayar la unión. Se incubaron alícuotas de 2 x 10⁵ células/pocillo durante 30 min. a 4°C con 100 µl de anticuerpo primario a las concentraciones indicadas. Las células se lavaron dos veces en PBS con suero bovino fetal (FBS) al 2% (v/v) antes de la adición de anticuerpo secundario de cabra anti-mAb humano, marcado con FITC- (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a dilución 1:500 en 100 µl/pocillo durante 30 min. a 4°C. Las células se lavaron dos veces en PBS con FBS al 2% (v/v) y se ensayaron por citometría de flujo usando un instrumento FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Los valores de EC₅₀ de la unión de los mAb 5F11 CHO, LEX y LEX^{Opt} a CD30 en células L540 se determinaron a partir de curvas de unión utilizando el software GraphPad Prism 3.0.

45 *Ensayo de ADCC.*

Se purificaron células efectoras mononuclear de sangre periférica humana a partir de sangre completa heparinizada por separación convencional en Ficoll-Paque. Las células (2x10⁶) se lavaron en PBS y se enviaron para genotipado. Las restantes células efectoras después se resuspendieron a 1x10⁶ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% (v/v) y 50 U/ml de IL-2 humana (Research Diagnostics, Concord, MA) y se incubaron durante una noche a 37°C. Las células efectoras se lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a 1x10⁷ células/ml antes de su uso. Se marcaron células diana L540 a 1 x 10⁶ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% (v/v) y probenecid 5 mM con BATDA (bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato) 20 µM durante 20 min. a 37°C. Las células diana se lavaron tres veces en PBS suplementado con HEPES 20 mM y probenecid 5 mM, se resuspendieron a 1 x 10⁵ células/ml y se añadieron a células efectoras en placas de 96 pocillos (1x10⁴ células diana y 5x10⁵ células efectoras/pocillo) a una proporción final de diana a efector de 1:50. La liberación máxima se obtuvo por incubación de células diana en Lysol al 3% (v/v) y liberación espontánea obtenida por incubación en medio de cultivo celular solo. Después de 1 h de incubación a 37°C, se recogieron 20 µl de sobrenadante de cada pocillo y se añadieron a pocillos que contenían 180 µl de solución de Europio. La reacción se leyó con un lector Perkin Elmer Fusion Alpha TRF usando un retardo de 400 µsegundos y filtros de excitación y emisión de 330/80 y 620/10 respectivamente. Los recuentos por segundo se representaron como una función de la concentración de anticuerpo y los datos se analizaron por regresión no lineal, de respuesta a dosis sigmoideo (pendiente variable) usando el software GraphPad Prism 3.0. El porcentaje de lisis específica se calculó como: (liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea) x 100. En todos los estudios, se incluyó mAb1 humano de

control de isotipo y se comparó con los mAb 5F11 CHO, LEX, y LEX^{Opt}. Otros controles incluyeron células diana y efectoras sin mAb, células diana sin células efectoras y células diana y efectoras en presencia de Lysol al 3% (v/v).

RESULTADOS

Expresión de mAb 5F11 en el sistema LEX.

5F11 (también conocido como MDX-060) es un anticuerpo anti-CD30 que se está desarrollando para el tratamiento de linfoma de Hodgkin y linfoma de células grande anaplásicas. Se construyeron dos vectores binarios para la expresión de 5F11 en el sistema LEX. El vector de expresión MDXA01 contenía genes con codones optimizados que codifican las cadenas pesada (H) y ligera (L) de 5F11 mientras que el vector MDXA04 contenía genes que codifican las cadenas H y L además de un gen quimérico FucT/XylT ARNi. Se generaron líneas transgénicas independientes para ambos vectores de expresión MDXA01 (165 líneas) y MDXA04 (195 líneas). Por simplicidad, los mAb derivados de MDXA01 (*N*-glucosilación de tipo silvestre), y los mAb derivados de MDXA04 (que contiene la construcción FucT/XylT ARNi) se mencionarán como 5F11 LEX y 5F11 LEX^{Opt}, respectivamente, en los siguientes análisis.

Las líneas de plantas transgénicas primero se exploraron para la expresión de mAb con un ELISA de IgG. Se ensayaron líneas LEX^{Opt} con elevados niveles de expresión de mAb adicionalmente para la actividad FucT y XylT. Las actividades transferasa en la mayoría de las líneas 5F11 LEX^{Opt} de alta expresión se redujeron a niveles del control negativo, lo que indica un silenciamiento eficaz en la mayoría e las líneas ensayadas (Figura 12). Las líneas 5F11 LEX^{Opt} no mostraron ninguna diferencia morfológica o de crecimiento en comparación con plantas *Lemna* de tipo silvestre (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el silenciamiento con ARNi de los genes FucT/XylT no tiene efecto sobre la viabilidad de la planta.

Las estabildades térmicas de los mAb 5F11 CHO, LEX, y LEX^{Opt} se determinaron usando calorimetría de exploración diferencial (DSC). Los tres mAb mostraron similar cinética en la curva de fusión (datos no mostrados) y temperaturas del punto de transición de fusión (Tabla 4 a continuación), lo que demuestra adicionalmente la integridad estructural de los mAb 5F11 LEX y LEX^{Opt} producidos en *Lemna* en comparación con el mAb 5F11 CHO. El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Figura 13A) y reductoras (Figura 13B) demostró que los mAb de las líneas 5F11 LEX^{Opt} y 5F11 CHO tuvieron perfiles proteicos similares.

Tabla 4. Comparación de las estabildades térmicas de los mAb 5F11 CHO, 5F11 LEX, y 5F11 LEX^{Opt} gluco-optimizado por calorimetría de exploración diferencial (DSC).

Anticuerpo	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
5F11 CHO	72	75	84
5F11 LEX	71	75	84
5F11 LEX ^{Opt}	72	76	84

Estructuras de *N*-glucano de los mAb 5F11 CHO, LEX, y LEX^{Opt}.

Se liberaron oligosacáridos *N*-glucano de mAb derivados 5F11 CHO, 5F11 LEX, y 5F11 LEX^{Opt} y se analizaron por MS MALDI-TOF y HPLC-QTOF en fase normal (NP). El análisis MS MALDI-TOF en modo reflectrón negativo de *N*-glucanos derivatizados con 2-AA de líneas 5F11 CHO indicó la presencia de cuatro *N*-glucanos principales con valores *m/z* correspondientes a GnGnF⁶ marcado con 2-AA (nomenclatura obtenida de www.proglican.com), Man5, GnA_{iso}F⁶, y AAF⁶ (Figura 14). La NP-HPLC separó el *N*-glucano GnA_{iso}F⁶ en sus dos isoformas (Gal unida al brazo α -1,6-Man o α -1,3-Man) llevando el número total de *N*-glucanos principales encontrados en 5F11 CHO a cinco (Figura 15). No se realizó la fragmentación MS/MS de los picos para confirmar la identidad de cada isoforma; sin embargo, la mayor abundancia del pico más temprano sugirió que Gal estaba unido al brazo α -1,6-Man de este *N*-glucano^{3,38}. El análisis MS QTOF en modo negativo en línea dio valores *m/z* correspondientes a GnGnF⁶ doblemente cargado, Man5, GnA_{iso}F⁶ (ambas isoformas), y AAF⁶, que confirma los resultados de MS MALDI-TOF (Tabla 5 a continuación). La integración del pico de la traza fluorescente reveló que GnGnF⁶, Man5, AGnF⁶, GnAF⁶, y AAF⁶ constituían el 50,8, 2,5, 26,1, 10,7 y 6,8%, respectivamente, de las estructuras totales de *N*-glucano de 5F11 CHO. Se descubrió que el 3,1% restante de *N*-glucanos era una mezcla de GnGn, GnM_{iso}F⁶, GnM_{iso}, y MM sin estructura mayor del 1,2% del total (datos no mostrados).

Tabla 5. Sumario de las masas observadas con MS MALDI-TOF y QTOF de los N-glucanos principales marcados con 2-AA de mAb MDXA-060 producidos por células CHO (CHO), *Lemna* tipo silvestre (LEX) o líneas *Lemna* glucóptimizadas que expresan la construcción de ARNi (LEX^{Opt}).

Nombre de N-glucano ^a	Estructura propuesta ^b	m/z teórico	MALDI-TOF observado ^c	Q-TOF observado ^c	% de área de pico ^c
CHO		[M-H] ⁻ 7[M-2H] ²⁻	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	
GnGnF ⁶ -2AA		1582,590 790,7911	1582,455	790,7825	50,8
Man5-2AA		1354,479 676,7436	1354,392	676,7343	2,50
GnA _{iso} F ⁶ -2AA		1744,642 871,8175	1744,492	871,7970	36,8
AAF ⁶ -2AA		1906,695 952,8438	1906,567	952,8181	6,80
LEX					
GnGn-2AA		1436,532 717,7622	1436,549	717,7894	8,40
GnGnX-2AA		1568,574 783,7833	1568,581	783,8150	17,2
GnGnXF ³ -2AA		1714,632 856,8122	1714,615	856,853	67,4
LEX^{Opt}					
GnGn-2AA		1436,532 717,7622	1436,523	717,7993	95,8

^aLos nombres de N-glucano se basan en la nomenclatura de Proglycan (www.proglycan.com). 2AA, ácido 2-aminobenzoico.

^bLos símbolos de las estructuras de N-glucano propuestas son las siguientes: ■, N-acetilglucosamina; ⊕, manosa; ●, galactosa; ◆, xilosilo; ▲, α-1,3-fucosilo; ▼, α-1,6-fucosilo; ●, ácido 2-aminobenzoico.

- 5 El análisis de MS MALDI-TOF de mAb 5F11 LEX de tipo silvestre reveló la presencia de tres especies principales con valores m/z correspondientes a GnGnXF³, GnGnX y GnGn (Figura 14). La NP-HPLC seguida de análisis MS QTOF en línea mostró tres picos fluorescentes principales con valores m/z correspondientes a GnGnXF³ doblemente cargado, GnGnX y GnGn, lo que confirma de nuevo los resultados de MS MALDI-TOF (Figura 15; Tabla 5). La integración de los picos fluorescentes indicó que GnGnXF³, GnGnX y GnGn constituían el 67,4, 17,2 y 8,4%, respectivamente, de los N-glucanos totales obtenidos de los mAb 5F11 LEX. El restante 7% de N-glucanos se determinó que era una mezcla de MM, GnM_{iso}, MMXF³, GnGnF³, GnM_{iso}XF³, Man6, Man7, Gn(FA)_{iso}XF³, Man8 y Man9 sin ningún N-glucano mayor del 2% del total (datos no mostrados). Se observaron resultados similares con mAb aislados de dos líneas 5F11 LEX transformadas independientemente (datos no mostrados).
- 10 En contraste con el mAb 5F11 LEX, los N-glucanos del mAb 5F11 LEX^{Opt} tenía GnGn como especie principal de N-glucano por análisis MS tanto MALDI-TOF como NP-HPLC-QTOF (Figuras 14 y 15; Tabla 5). GnGn comprendía el 95,8% de los N-glucanos totales con el restante 4,2% de N-glucanos determinado a ser MM, GnM_{iso}, GnA_{iso}, Man6, Man7 y Man8 sin una estructura mayor del 1,2% de los N-glucanos totales. Ninguno de los N-glucanos LEX^{Opt} contenía fucosilo (Fuc) o xilosilo (Xyl). Estos resultados demostraron que la co-expresión de una construcción de ARNi dirigida a FucT y XylT de *Lemna* provocaba la eliminación completa de N-glucanos que contienen Fuc y Xyl de mAb 5F11 LEX^{Opt} y producía glucoformas de mAb altamente homogéneas. Se obtuvieron resultados similares con dos mAb 5F11 LEX^{Opt} independientes (datos no mostrados).
- 15 La ausencia de Fuc o Xyl en N-glucanos de mAb 5F11 LEX^{Opt} se confirmó adicionalmente por análisis de monosacáridos (Tabla 6 a continuación). Se liberaron los monosacáridos de mAb 5F11 CHO, LEX y LEX^{Opt} por hidrólisis ácida y se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC) acoplada a detección amperométrica pulsada (PAD). Las proporciones de monosacáridos para restos Man y GlcNAc fueron similares para mAb CHO y LEX de tipo silvestre y se correlacionaron bien con los valores esperados. Los mAb LEX tenían un contenido significativamente disminuido de Gal y Fuc y tenían un aumento significativo de Xyl en comparación con mAb derivados de CHO. El análisis de monosacáridos de mAb derivados de *Lemna* reveló que aunque Fuc y Xyl estaban presentes en N-glucanos LEX de tipo silvestre, no se detectaron en mAb LEX^{Opt}. Estos resultados confirmaron los datos de perfilado de oligosacáridos y sugirieron adicionalmente que el silenciamiento con ARNi de la actividad XylT y FucT de *Lemna* cambió la vía de N-glucosilación de *Lemna* para producir mAb desprovistos de N-glucanos específicos de plantas.
- 20
- 25
- 30
- 35

Tabla 6. Monosacáridos liberados de mAb 5F11 CHO, LEX y LEX^{Opt} por hidrólisis ácida y analizados por HPAEC-PAD. El contenido de monosacáridos de cada mAb se determinó por normalización frente a controles de carbohidrato.

Monosacárido	5F11 CHO pmol (% total)	5F11 LEX pmol (% total)	5F11 LEX ^{Opt} pmol (% total)
Fuc	254 (20)	232 (13)	0
GlcNAc	605 (47)	773 (45)	1.003 (67)
Gal	75 (6)	0	0
Man	355 (27)	491 (29)	501 (33)
Xyl	0	226 (13)	0
Total	1.289 (100)	1.722 (100)	1.504 (100)

5 Actividad funcional de mAb 5F11 CHO, LEX y LEX^{Opt}.

Las propiedades de unión a antígeno de los mAb 5F11 CHO, 5F11 LEX, y 5F11 LEX^{Opt} se determinaron usando células L540 que expresan CD30. Los tres mAb tuvieron curvas de unión casi idénticas (Figura 15). Las concentraciones de EC₅₀ se determinaron en 0,180 µg/ml, 0,227 µg/ml, y 0,196 µg/ml para CHO, 5F11 LEX, y 5F11 LEX^{Opt}, respectivamente (Figura 16), lo que indica que la unión a antígeno para los tres mAb fue similar.

La unión a FcR de mAb CHO, LEX, y LEX^{Opt} se determinó incubando mAb con células efectoras que expresan dos alotipos FcγIIIa humanos diferentes (Phe¹⁵⁸ y Val¹⁵⁸). 5F11 LEX tuvo un aumento de 1,7 veces en FcγIIIaPhe¹⁵⁸ y una disminución de 0,4 veces en la unión a FcγIIIaVal¹⁵⁸ en comparación con el mAb derivado de CHO, lo que demuestra que la unión al receptor para mAb CHO y LEX fue similar. En contraste, los mAb LEX^{Opt} tuvieron una afinidad 27 y 15 veces superior para FcγIIIaPhe¹⁵⁸ y FcγIIIaVal¹⁵⁸, respectivamente, que los mAb CHO (Figura 17). Estos resultados sugirieron que el silenciamiento con ARNi de las actividades FucT y XylT de *Lemna* en línea LEX^{Opt} produjo mAb con unión potenciada a FcR.

Las actividades ADCC de los mAb CHO, LEX y LEX^{Opt} se determinaron incubando mAb con células efectoras humanas homocigóticas (FcγIIIaPhe¹⁵⁸) o heterocigóticas (FcγIIIaPhe/Val¹⁵⁸) y células diana L540 marcadas con BATDA (bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-6,6' = dicarboxilato (Figura 17). Los mAb 5F11 LEX (31%) tuvieron el mismo porcentaje máximo de lisis celular que los mAb CHO (31%) usando células efectoras humanas FcγIIIaPhe/Val¹⁵⁸ heterocigóticas (Figura 18) con valores de EC₅₀ similares (0,04210 y 0,05887, respectivamente). El porcentaje máximo de lisis celular para mAb LEX (27%) estuvo ligeramente aumentado en comparación con mAb CHO (15%) usando células efectoras FcγIIIa Phe/Phe¹⁵⁸ homocigóticas, con valores de EC₅₀ de 0,05759 y 0,03368, respectivamente. De forma importante, los mAb LEX^{Opt} tuvieron una actividad ADCC significativamente aumentada en comparación con mAb 5F11 CHO y LEX, independientemente del genotipo donante. Esto se evaluó por un aumento tanto en la potencia como en la eficacia. El porcentaje máximo de lisis para 5F11 LEX^{Opt} fue del 45% para ambos experimentos. El valor de EC₅₀ de 0,01306 fue de 3 a 5 veces inferior que los mAb 5F11 LEX y 5F11 CHO, respectivamente, para células efectoras FcγIIIa Val/Phe¹⁵⁸. El valor de EC₅₀ de 0,01990 fue de 2 a 3 veces inferior para las células efectoras FcγIIIa Phe/Phe¹⁵⁸. Estos resultados demuestran que la eliminación de los *N*-glucanos que contiene Fuc y Xyl de mAb 5F11 LEX^{Opt} causó una potenciación en la actividad ADCC y por tanto pueden mejorar su potencial terapéutico.

35 Análisis de MS RP-HPLC-Q-TOF de IgG intacta para 5F11 LEX y 5F11 LEX^{Opt}

Se desalinizaron IgG purificadas por proteína A (50 µg) usando el sistema HPLC Waters 2695 equipado con una columna Poros R1-10 (2 mm x 30 mm; Applied Biosystems). Las IgG se detectaron y analizaron usando un detector UV de longitud de onda dual Waters 2487 (280 nm) y el Waters Q-TOF API US. Las separaciones se realizaron a 0,5 ml/min, 60°C, usando ácido trifluoroacético (TFA; disolvente A) al 0,05% (v/v) y TFA al 0,05% (v/v), acetonitrilo al 80% (v/v) (disolvente B). La dilución de la muestra se realizó usando un aumento lineal del 30 al 50% de B durante 5 minutos, un aumento del 80% de B durante 5 minutos. La proporción de disolvente permaneció al 80% de B durante 4 minutos adicionales, seguido por un lavado de 100% de B durante 1 minuto y equilibrado de la columna con B al 30% durante 15 minutos antes del siguiente procesamiento.

El análisis Q-TOF se realizó en modo iónico positivo con temperaturas de fuente y de solvatación de 100°C y 300°C, respectivamente, y voltajes de capilar y cono de 3,0 y 60 V, respectivamente. Los datos son el resultado de combinar ≥ 100 exploraciones individuales y de convolución al espectro de masa precursor usando MaxEnt 1.

Véase también Triguero et al. (2004) Plant Biotechnol. J. 3: 449-457; Takahashi et al. (1998) Anal. Biochem. 255: 183-187; Dillion et al. (2004) J. Chromatogr. A. 1053: 299-305.

La Figura 19 muestra el análisis de masa intacta de composiciones de mAb 5F11 LEX producidas en *L. minor* de tipo silvestre que comprende la construcción MDXA01. Cuando no se suprime la expresión de XylT y FucT en *L. minor*, la composición de mAb 5F11 LEX recombinante comprende al menos 7 glucoformas diferentes, siendo la

glucoforma GOXF³ la especie predominante presente. Obsérvese la ausencia de un pico que represente la glucoforma G0.

5 La Figura 20 muestra el análisis de masa de glucano de la cadena pesada del mAb 5F11 LEX producido en *L. minor* de tipo silvestre que comprende la construcción MDXA01. Cuando no se suprime la expresión de XylT y FucT en *L. minor*, la especie de *N*-glucano predominante presente es GOXF³, reflejando picos principales adicionales la especie GOX. Obsérvese la presencia minoritaria de la especie de glucano G0.

10 La Figura 21 muestra el análisis de masa intacta de las composiciones de mAb 5F11 LEX^{Opt} producidas en *L. minor* transgénico que comprende la construcción MDXA04. Cuando no se suprime la expresión de XylT y FucT en *L. minor*, la composición de mAb intacto contiene solamente *N*-glucanos G0. Además, la composición es sustancialmente homogénea para la glucoforma G0 (pico 2), donde ambos sitios de glucosilación están ocupados por la especie de *N*-glucano G0, reflejando dos picos minoritarios cantidades traza de glucoformas precursoras (pico 1, que muestra mAb que tiene una región Fc donde el dominio C_H2 de una cadena pesada tiene una especie de glucano G0 unida a Asn 297, y el dominio C_H2 de la otra cadena pesada está sin glucosilar; y pico 3, que muestra mAb que tiene una región Fc donde el sitio de glucosilación de Asn 297 en cada uno de los dominios C_H2 tiene una especie de glucano G0 unida, con una tercera especie de glucano G0 unida a un sitio de glucosilación adicional dentro de la estructura del mAb).

20 La Figura 22 muestra el análisis de masa de glucano de la cadena pesada del mAb 5F11 LEX^{Opt} producido en *L. minor* transgénico que comprende la construcción MDXA04. Cuando se suprime la expresión de XylT y FucT en *L. minor*, la única especie de *N*-glucano fácilmente detectable unida a los sitios de glucosilación Asn 297 de los dominios C_H2 de las cadenas pesadas es G0.

25 DISCUSIÓN

La gluco-optimización de 5F11 se consiguió por co-expresión con un casete de ARNi dirigido al silenciamiento de los genes FucT y XylT endógenos de *Lemna*. Este silenciamiento simultáneo de los genes tanto FucT como XylT se consiguió usando un transcrito de ARNi único. La ausencia de FucT y XylT en el mAb LEX^{Opt} se confirmó por MALDI-TOF, MS NP-HPLC-QTOF, y análisis de monosacáridos de *N*-glucanos purificados del mAb 5F11 LEX^{Opt}. Estos análisis corroboran la usencia de actividad transferasa observada en membranas microsómicas. De forma importante, >95% de los *N*-glucanos liberados de los mAb LEX^{Opt} fueron de una única estructura, GnGn, lo que indica que esta estrategia tuvo el beneficio añadido de producir mAb con un perfil homogéneo de *N*-glucano. Se descubrió que los mAb 5F11 LEX y LEX^{Opt} son indistinguibles con respecto a la estabilidad térmica y la unión a antígeno en comparación con 5F11 CHO. También se descubrió que el análisis electroforético fue similar para los tres mAb. De hecho, la única diferencia estructural detectada fue en los perfiles de *N*-glucano de mAb.

40 Sin limitarse por la teoría, la capacidad de las líneas 5F11 LEX^{Opt} de producir mAb con una única especie principal de *N*-glucano puede basarse en la distribución más uniforme de la glucoforma de mAb encontrada en *Lemna* de tipo silvestre. Los *N*-glucanos liberados de los mAb purificados de tabaco, alfalfa y musgo de tipo silvestre muestran que la heterogenicidad de la glucoforma de mAb en plantas con *N*-glucosilación de tipo silvestre puede variar de 5 (alfalfa) a 8 (tabaco) estructuras principales diferentes. 5F11 LEX tiene solamente 3 estructuras de *N*-glucano principales (GnGn, GnGnX y GnGnXF). Esta serie simple de *N*-glucanos en los mAb producidos por *Lemna* de tipo silvestre puede proporcionar un punto de partida más susceptible para gluco-optimización que conduce a una mayor homogeneidad que la observada en otros sistemas.

La función celular efectora mediada por el receptor Fc ha demostrado ser importante para la actividad *in vivo* de muchos mAb terapéuticos. En este estudio, se comparó la actividad ADCC de los mAb 5F11 CHO, 5F11 LEX, y 5F11 LEX^{Opt}. Como la expresión de FcR en células NK y macrófagos responsables de la actividad ADCC es FcγRIIIa, también se comparó la unión de los diversos mAb a este receptor. Los resultados analizados anteriormente muestran que el mAb 5F11 LEX^{Opt} tiene un aumento en la afinidad de unión (15-25 veces) y la unión máxima (4-5 veces) a FcγRIIIa así como actividad ADCC potenciada en comparación con los mAb 5F11 CHO y 5F11 LEX. La eliminación de Fuc α-1,6-ligado de diversos mAb producidos en otros sistemas de expresión ha demostrado previamente aumentar la unión a FcR y potenciar la función ADCC. Los resultados presentados en este documento sugieren que la eliminación de Fuc α-1,3-ligado de los mAb 5F11 LEX^{Opt} tiene el mismo efecto sobre la función del mAb que la eliminación del Fuc α-1,6-ligado.

60 En este estudio, se evaluaron dos isoformas polimórficas de origen natural de FcγRIIIa en el resto 158⁴¹, Val¹⁵⁸ y Phe¹⁵⁸. 5F11 LEX^{Opt} muestra una mayor afinidad de unión a FcγRIIIa Val¹⁵⁸ en comparación con FcγRIIIa Phe¹⁵⁸ que la que se ha observado con otros mAb IgG1. El hecho de que se observara un aumento en la unión con 5F11 LEX^{Opt} con ambas isoformas es importante ya que se descubrió que la unión diferencial a Val¹⁵⁸ sobre Phe¹⁵⁸ era predictiva de la sensibilidad clínica e inmunológica de ciertos grupos de pacientes que reciben tratamiento anti-CD20. Este aumento en la unión podría conducir a más resultados clínicos positivos sobre una amplia base de población.

También se observó un aumento similar en la actividad ADCC. En este estudio, el mAb 5F11 LEX^{Opt} mostró un aumento en la lisis celular y una disminución en el valor de EC₅₀, provocando un aumento en la eficacia y la potencia en comparación con 5F11 CHO. Esto corresponde a un aumento de 20 veces en la actividad, determinada tomando el porcentaje máximo de lisis de 5F11 CHO y calculando la concentración del mAb 5F11 LEX^{Opt} que da lugar al mismo porcentaje de lisis celular. Como con el estudio de unión a FcγRIIIa, el aumento en la actividad ADCC se observó con donantes de células efectoras tanto homocigóticas FcγRIIIaPhe/Phe¹⁵⁸ y heterocigóticas FcγRIIIaPhe/Val¹⁵⁸.

La robustez de esta estrategia de gluco-optimización se ha demostrado con múltiples líneas vegetales de *Lemna* independientes que expresan el mAb 5F11 LEX^{Opt} así como con otros mAb expresados en el sistema de expresión *Lemna*. Además, no hay diferencias evidentes en el fenotipo o velocidad de crecimiento de la planta en comparación con plantas *Lemna* de tipo silvestre. A diferencia de los sistemas de cultivo de células de mamífero donde la heterogeneidad de *N*-glucano puede cambiar con las condiciones de cultivo, la escala de cultivo y el periodo de crecimiento, se ha demostrado que la uniformidad de glucanos observada con mAb LEX^{Opt} es constante en una diversidad de condiciones y escalas de cultivo (datos no mostrados).

En conclusión, se usó una estrategia ARNi para producir un anticuerpo anti-CD30 gluco-optimizado en el sistema de expresión *Lemna*. El mAb resultante consta de una única estructura de *N*-glucano principal; sin ninguna evidencia de Fuc y Xyl. Además, el mAb optimizado resultante tiene un aumento en la actividad ADCC y la actividad de unión a FcγRIIIa en comparación con un mAb derivado de CHO. El perfil de glucosilación homogéneo obtenido en mAb producidos en un sistema de expresión *Lemna* que tiene esta estrategia de eliminación génica FucT+XylIT hace posible expresar mAb con consistencia de producción aumentada.

SUMARIO DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N°	SECUENCIA	SEC ID N°	SECUENCIA
1	VH a.a. 5F11	19	VK CDR2 a.a. 5F11
2	VH a.a. 17G1	20	VKCDR2 aa. 17G1
3	VH a.a. 2H9	21	VK CDR2 a.a. 2H9
4	VK a.a. 5F11	22	VK CDR3 a.a. 5F11
5	VK a.a. 17G1	23	VKCDR3 a.a. 17G1
6	VK a.a. 2H9	24	VK CDR3 a.a. 2H9
7	VH CDR1 a.a. 5F11		
8	VHCDR1 a.a. 17G1	25	VH 4-34 línea germinal aa
9	VH CDR1 a.a. 2H9	26	VH 3-07 línea germinal aa
10	VH CDR2 a.a. 5F11	27	VK L15 línea germinal aa
11	VH CDR2 a.a. 17G1	28	VK A27 línea germinal aa
12	VH CDR2 a.a. 2H9	29	VK L6 línea germinal aa
13	VH CDR3 a.a. 5F11	30	VH n.t. 5F11
14	VH CDR3 a.a. 17G1	31	VH n.t. 17G1
15	VH CDR3 a.a. 2H9	32	VH n.t. 2H9
16	VKCDR1 a.a. 5F11	33	VK n.t. 5F11
17	VKCDR1 a.a. 17G1	34	VK n.t. 17G1
18	VKCDR1 a.a. 2H9	35	VK n.t. 2H9

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MEDAREX, INC.

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD30 QUE CARECEN DE RESTOS FUCOSILO Y XILOSILO

<130> MXI-357PC

10 <140> PCT/US07/01451
<141> 17-01-2007

<150> 60/759.298
<151> 17-01-2006

15 <150> 60/790.373
<151> 07-04-2006

20 <150> 60/791.178
<151> 11-04-2006

<150> 60/812.702
<151> 09-06-2006

25 <150> 60/836.998
<151> 11-08-2006

<150> 60/837.202
<151> 11-08-2006

30 <160> 43

<170> Patent In Ver. 3.3

35 <210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 1

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

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45

<400> 2

```

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

```

5 <210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3

```

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

```

15 <210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 4

```

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

```

<210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

```

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

```

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Ala Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Asn Ser Trp Met Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT

ES 2 396 569 T3

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

15

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Thr Ala Tyr
1

25

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 14

Val His Trp Tyr Phe His Leu
1 5

35

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

40

Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5

45

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr
1 5 10

50

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

ES 2 396 569 T3

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

15

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

25

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 20

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

35

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

40

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45

<400> 22

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5

50

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55

<400> 23

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg

<210> 26
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

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

<210> 28
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

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

<210> 29
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

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

<210> 30
 <211> 282
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (282).
 <400> 30

```

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc etc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt gct tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggg gac atc aat cat ggt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc etc aag 192
Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

aag ctg aac tct gta acc gcc gcg gac acg acc gtc tcc tca 282
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Thr Val Ser Ser
85 90

```

<210> 31
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS.
 <222> (1)..(348)

<400> 31

```

gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga etc tcc tgt gta gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tct 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg 144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcc aac ata aac gaa gat gga agt gag aaa ttc tat gtg gac tct gtg 192
Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc ttc tcc aga gac aac gcc gag aac tca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg agg gtt cat tgg tac ttc cat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc 336
Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
100 105 110

act gtc tcc tca 348
Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 32
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (348)

10

<400> 32

```

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1          5.          10          15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
          20          25          30

tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aag tac acc ccg tcc ctc aag 192
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
          50          55          60

agc cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag cac caa ttc tcc ctg 240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys His Gln Phe Ser Leu
          65          70          75          80

aag ctg agc tct gtg acc gcc gcc gac acg gct gtg tat tac tgt gcg 288
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95

aga gag act gtc tac tac ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc 336
Arg Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
          100          105          110

act gtc tcc tca 348
Thr Val Ser Ser
          115
    
```

15

<210> 33
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

25

<400> 33

```

gac atc cag atg acc cag tct cca acc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30

tta acc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat gat agt tac cct atc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile
          85           90           95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 34
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 34

```

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1           5           10           15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50           55           60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
          65           70           75           80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95

tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 324
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 35

<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 35

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1           5           10           15

gaa aga gcc acc ctg tcc tgc agg gcc agt cag agt gta agc agc aac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
          20           25           30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctg ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ctg agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Leu Ser Gly
          50           55           60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctg acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
        65           70           75           80

gaa gat ttt gca gct tat tac tgt caa cag cgt agc aac tgg ccg tgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
          85           90           95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 36
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 36
atgtctgact gctgctggtg ctctcaac 28

<210> 37
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 37
atgtctagaa tgcagcagca agtgcacc 28

<210> 38
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 38
 atgactagtt gcgaagccta ctcggcaac agc 33
 <210> 39
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 39
 15 atgggatccg aatctcaaga acaactgtcg 30
 <210> 40
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 25 <400> 40
 atgggtacct gcgaagccta ctcggcaac agc 33
 <210> 41
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 35 <400> 41
 atgggatcca ctggctggga gaagttctt 29
 <210> 42
 <211> 28
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 42
 atggagctct gctgctgggtg ctctcaac 28
 <210> 43
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 43
 60 atgggtacca tgcagcagca agtgcacc 28

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD30 glucosilado aislado, donde al menos el 90% es una única glucoforma, que carece de restos fucosilo y xilosilo.

2. Un anticuerpo anti-CD30 glucosilado aislado de acuerdo con la reivindicación 1 que no contiene restos galactosilo.

3. Una composición de glucoproteína que comprende una composición de anticuerpo anti-CD30 que comprende un perfil de *N*-glucosilación donde al menos el 90% de las especies de *N*-glucanos presentes en dicho perfil son GlcNAc2Man3GlcNAc2 (G0), comprendiendo dicho perfil una cantidad traza de especie de *N*-glucano precursor, donde dicha especie de *N*-glucano precursor se selecciona entre Man3GlcNAc2, GlcNAc1Man3GlcNAc2 donde GlcNAc1 está unido al brazo 1,3 manosa (MGn), GlcNAc1Man3GlcNAc2 donde GlcNAc1 está unido al brazo 1,6 manosa (GnM), y cualquier combinación de los mismos.

4. La composición de glucoproteína de la reivindicación 3, donde dicha composición de anticuerpo:

(a) comprende una región Fc seleccionada entre el grupo compuesto por una región de IgG, IgG2, IgG3, e IgG4;

(b) es un anticuerpo humano;

(c) es un anticuerpo humanizado o quimérico; tal como un anticuerpo humanizado o quimérico preparado a partir de un anticuerpo anti-CD30 de ratón seleccionado entre AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 y Ber-H8;

(d) es un anticuerpo monoclonal;

(e) muestra afinidad de unión aumentada por un FcγRIII;

(f) potencia la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células que expresan CD30 de superficie celular; o

(g) muestra fagocitosis mediada por macrófagos aumentada.

5. La composición de glucoproteína de la reivindicación 3 o 4, donde la composición de anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 7, 8, y 9;

(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 10, 11, y 12;

(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 13, 14, y 15;

(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 16, 17, y 18;

(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 19, 20, y 21;

(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 22, 23, y 24.

6. La composición de glucoproteína de la reivindicación 5, donde la composición de anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 7; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 10, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 13, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 16, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 19 y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 22;

(b) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 8, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 11, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 14, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 17, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 20 y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 23;

(c) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 9, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 12, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 15, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 18, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 21 y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 24; o

(d) una región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 1, 2 y 3 y una región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 4, 5 y 6.

7. La composición de glucoproteína de la reivindicación 6, donde:

(a) la región variable de cadena pesada de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y la región variable de cadena ligera de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4;

(b) la región variable de cadena pesada de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 y la región variable de cadena ligera de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5; o

(c) la región variable de cadena pesada de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 y la región variable de cadena ligera de la composición de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

8. La composición de glucoproteína de la reivindicación 4, donde la composición de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se obtiene de un gen humano V_H 4-34 o V_H 3-07 y/o una región variable de cadena ligera que un producto de o se obtiene de un gen humano V_K L15, A27 o L6.

9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de glucoproteína de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.

10. Una célula hospedadora que comprende la composición de glucoproteína de la reivindicación 4, donde la célula hospedadora es opcionalmente una célula hospedadora vegetal como una célula de lenteja acuática.

11. Una célula hospedadora que comprende genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera que codifican un anticuerpo anti-CD30, donde dicha célula hospedadora carece de una fucosiltransferasa y una xilosiltransferasa de modo que el anticuerpo anti-CD30 expresado por dicha célula hospedadora carece de restos fucosilo y xilosilo, donde la célula hospedadora es opcionalmente una célula vegetal, donde la célula vegetal es opcionalmente un miembro de la familia *Lemna minor*.

12. La célula hospedadora de la reivindicación 11, donde:

(a) los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera son genes de inmunoglobulina humana de cadena y ligera; o

(b) dicha fucosiltransferasa es FucT y dicha xilosiltransferasa es XylT.

13. Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de células CD30⁺ tales como células tumorales que comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-CD30, donde al menos el 90% es un única glucoforma, que carece de restos fucosilo y xilosilo, en condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de dichas células.

14. Un anticuerpo anti-CD30, donde al menos el 90% es una única glucoforma, que carece de restos fucosilo y xilosilo, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD30 o en un método para tratar un trastorno autoinmune.

15. El método de la reivindicación 13 o el anticuerpo de la reivindicación 14, donde dicho anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

16. El anticuerpo de la reivindicación 14 ó 15, donde las células tumorales son de una enfermedad seleccionada entre enfermedad de Hodgkin (HD), linfoma de células grandes anaplásicas (ALCL), linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfomas cutáneos de células T, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T en el adulto (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cd/cc), linfomas de células T grandes difusas de linaje B, linfoma de células T tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfoma de células T en el adulto (ATL), linfomas basados en cavidad corporal asociada con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas indiferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincker), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, linfomas de células T CD30⁺ y linfomas de células B CD30⁺.

5F11 anti-CD30 VH

Segmento V: Locus: 4-34

Segmento D: Locus - 7-27

Segmento J: JH4b

```

1      Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
      CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55     S L T C A V Y G G S F S A Y Y W S W
      TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GCT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109    I R Q P P G K G L E W I G D I N H G
      ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAC ATC AAT CAT GGT

                                CDR2
                                -----
163    G G T N Y N F S L K S R V T I S V D
      GGA GGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

217    T S K N Q F S L K L N S V T A A D T
      ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTA ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
271    A V Y Y C A S L T A Y W G Q G S L V
      GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGC CTA ACT GCC TAC TGG GGC CAG GGA AGC CTG GTC
      D7-27/DHQ52 → JH4b

325    T V S S
      ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 1A

5F11 anti-CD30 VL

Segmento V: Locus: L15

Segmento J: JK5

```

      D I Q M T Q S P T S L S A S V G D R
1   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA ACC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V T I T C R A S Q G I S S W L T W Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA ACC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y D S Y P I T F G Q G T R L E I K
271 TAT GAT AGT TAC CCT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

      L
      ↓ JK5

```

Fig. 1B

17G1 anti-CD30 VH
 Segmento V: Locus: 3-07
 Segmento D: No encontrado
 Segmento J: JH2

```

1   E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L
    GAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55  R L S C V A S G F T F S N S W M S W
    AGA CTC TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AAC TCT TGG ATG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G K G L E W V A N I N E D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC ATA AAC GAA GAT

                                CDR2
                                -----
163 G S E K F Y V D S V K G R F T F S R
    GGA AGT GAG AAA TTC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC TTC TCC AGA

                                CDR3
                                -----
217 D N A E N S L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAC GCC GAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V Y Y C A R V H W Y F H L W G R
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GTT CAT TGG TAC TTC CAT CTC TGG GGC CGT

                                JH2
                                -----
323 G T L V T V S S
    GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA
  
```

Fig. 2A

17G1 anti-CD30 VL

Segmento V: Locus: A27

Segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                -----
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      -----
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                -----
      T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      -----
      Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
      |
      ↓ JK1

```

Fig. 2B

2H9 anti-CD30 VH
 Segmento V: Locus: 4-34
 Segmento D: Locus: - 5-12
 Segmento J: JH2

1 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
 CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

CDR1
 S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
 55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

CDR2
 I R Q P P G K G L E W I G E I N H S
 109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

CDR2
 G S T K Y T P S L K S R V T I S V D
 163 GGA AGC ACC AAG TAC ACC CCG TCC CTC AAG AGC CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

T S K H Q F S L K L S S V T A A D T
 217 ACG TCC AAG CAC CAA TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

CDR3
 A V Y Y C A R E T V Y Y F D L W G R
 271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG ACT GTC TAC TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT

↓ JH2

G T L V T V S S
 325 GGC AOC CTG GTC ACT GTC TCC TCA

Fig. 3A

2H9 anti-CD30 VL

Segmento V: Locus: L6

Segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S S N L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTA AGC AGC AAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R L S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG CTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P W T F G Q G T K V E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCG TGG ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

      ↓ JK1

```

Fig. 3B

ADCC: Cr
L540 sin CD30

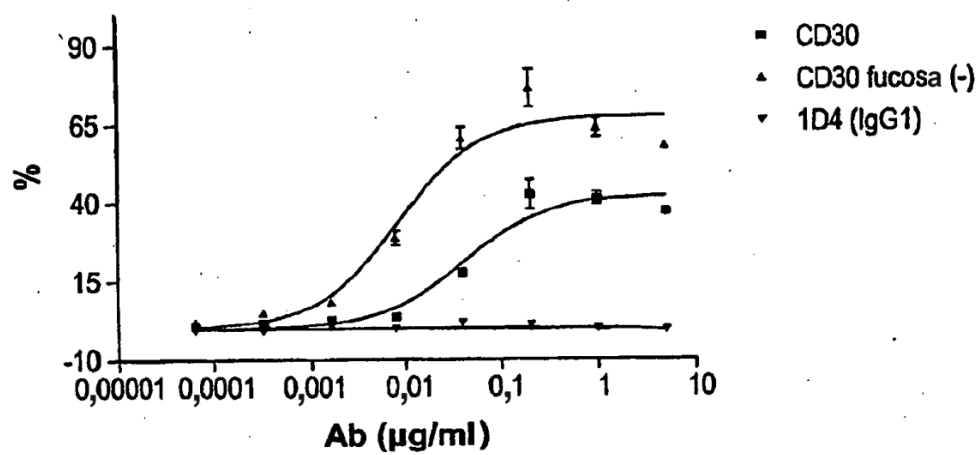


Fig. 4

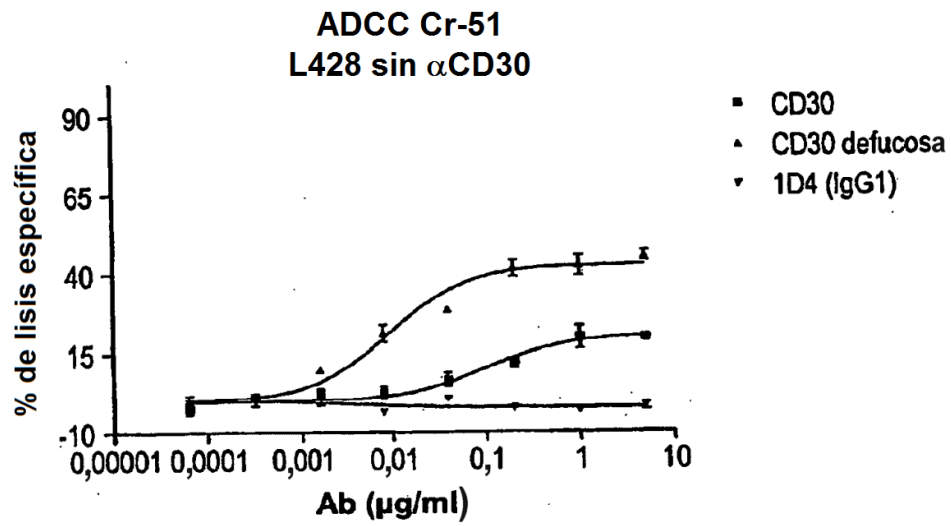


Fig. 5

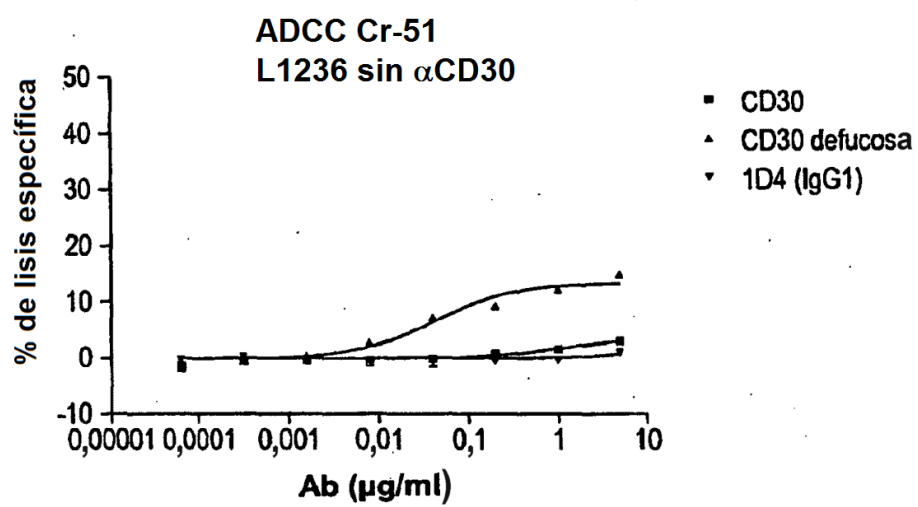


Fig. 6

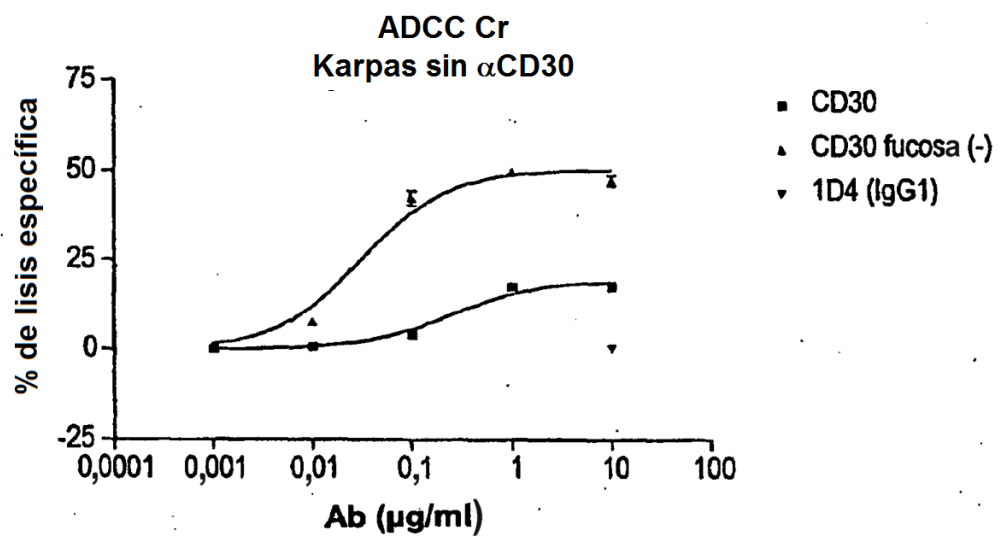


Fig. 7

Secuencias de la línea germinal de cadena pesada

Línea germinal 4-34: Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S ^{CDR1}

W I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S ^{CDR2}

V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R ^{CDR3}

Línea germinal 3-07: E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M S W ^{CDR1}

~ ~ ~ ~ ~
V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R ^{CDR2}

D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R

Fig. 8A

Secuencias de la línea germinal de cadena ligera

Línea germinal L6: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A ^{CDR1}
W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G ^{CDR2}
T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N W ^{CDR3}

Línea germinal A27: E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T ^{CDR1} ^{CDR2}
G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q G S S ^{CDR3}

Línea germinal A15: D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S ^{CDR1} ^{CDR2}
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y ^{CDR3}

Fig. 8B

Bloqueo de la actividad ADCC con el anticuerpo anti-CD16 3G8

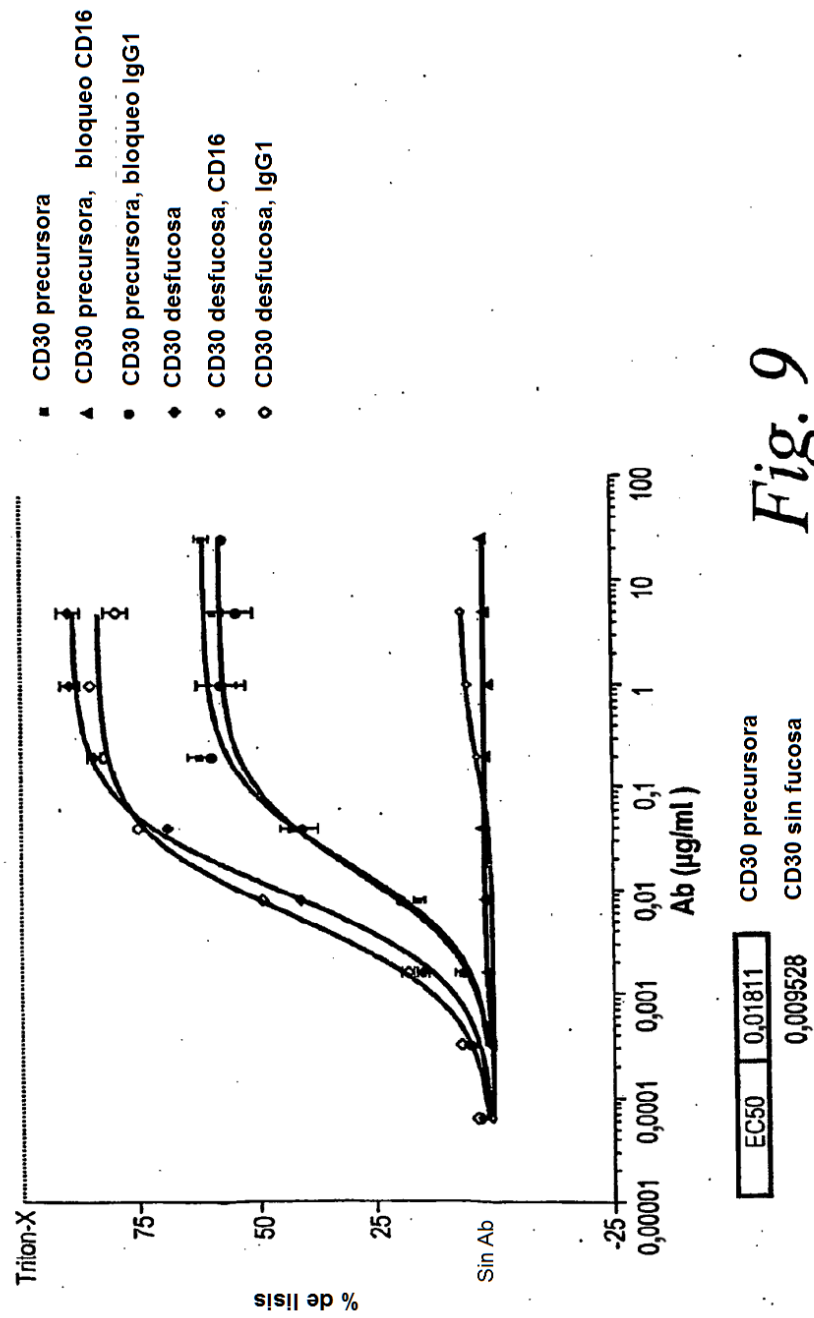
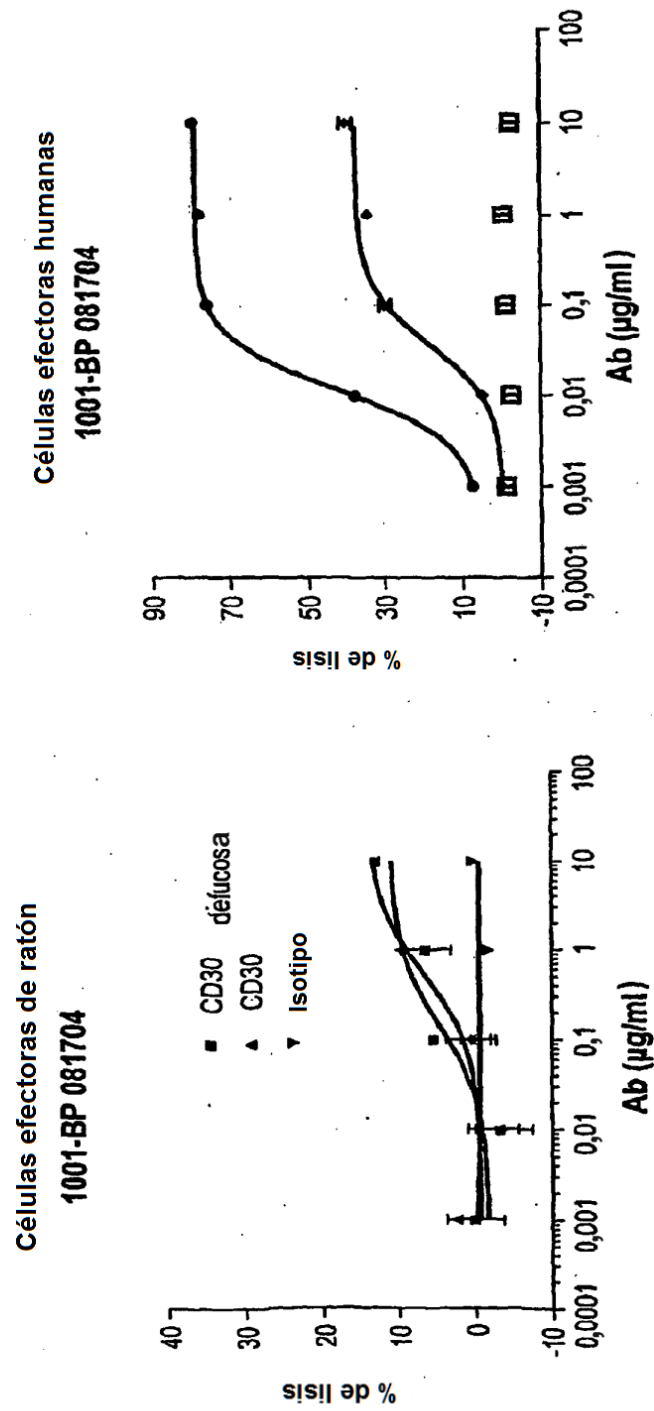


Fig. 9

Comparación del ensayo de ADCC con células efectoras de ratón y humanas



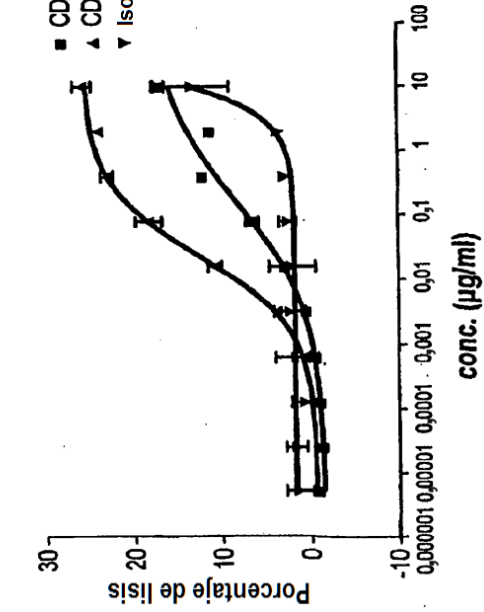
porcentaje específico = (muestra - sin Ab)/(Triton-x - sin Ab) x 100%

Fig. 10

Ensayo de ADCC usando sangre de mono cynomolgus

Experimento n° 1

ADCC CD30 con células Karpas 299 y cyno
Proporción T/E 1:50
Tratamiento durante una noche con IL2 50 U/ml



Experimento n° 1

ADCC CD30 con células Karpas 299 y cyno
Proporción T/E 1:50
Tratamiento durante una noche con IL2 50 U/ml

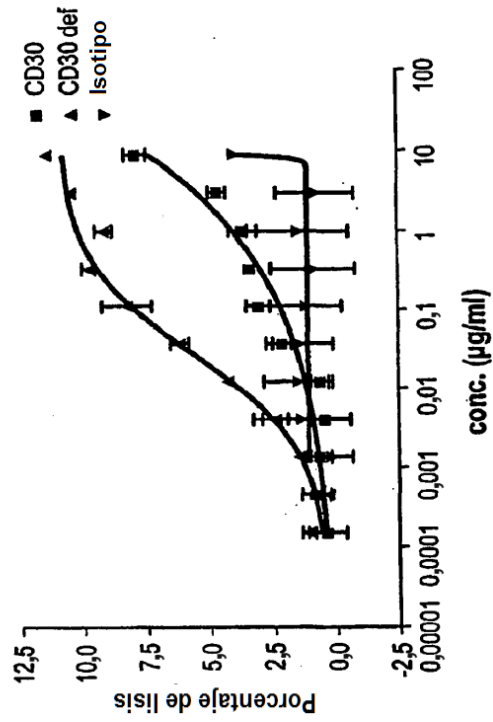


Fig. 11

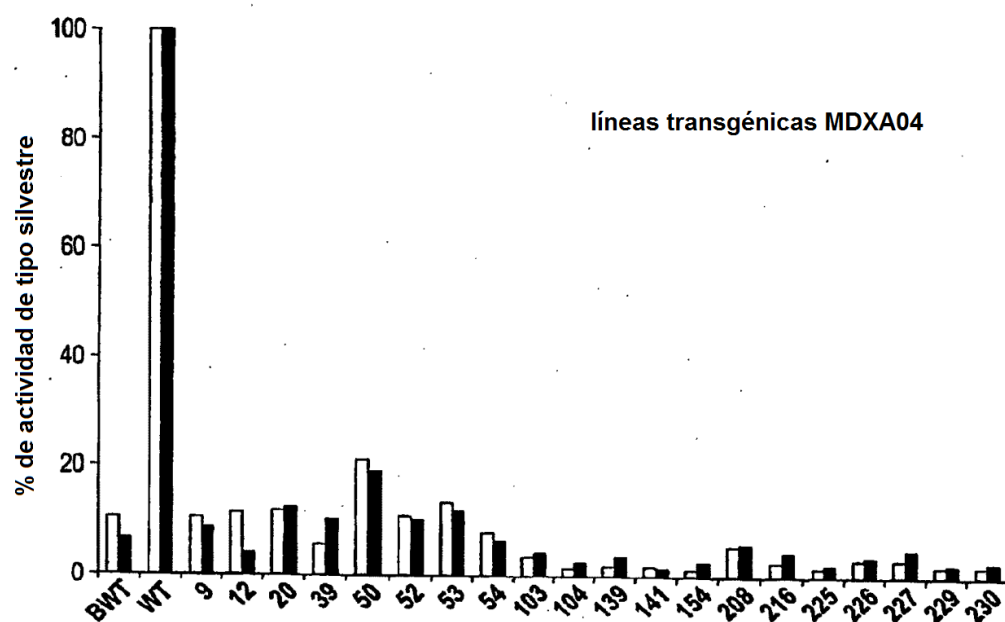


Fig. 12

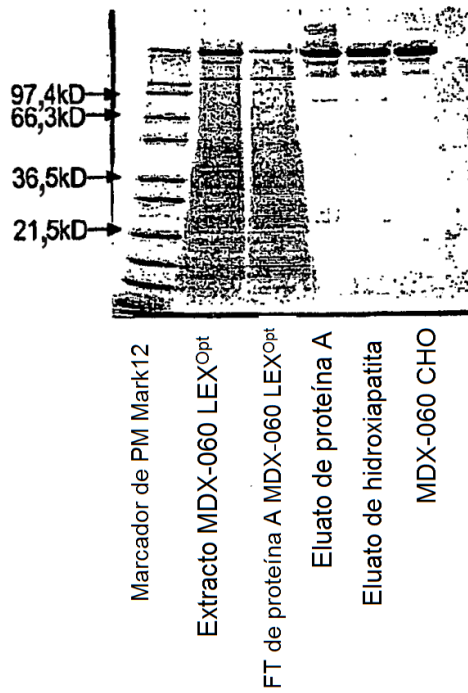


Fig. 13A

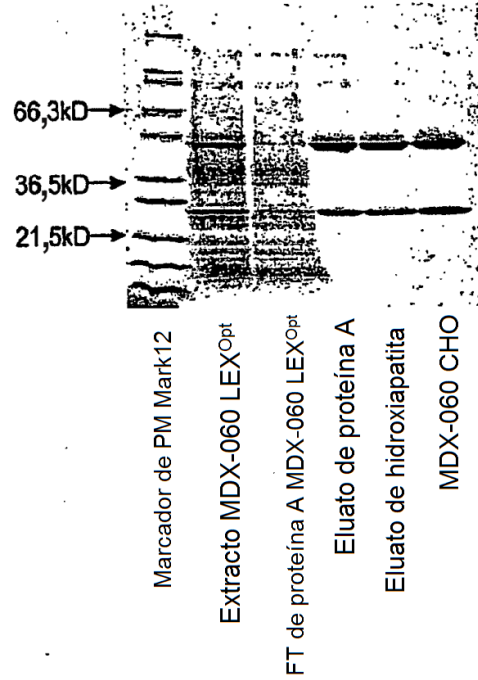


Fig. 13B

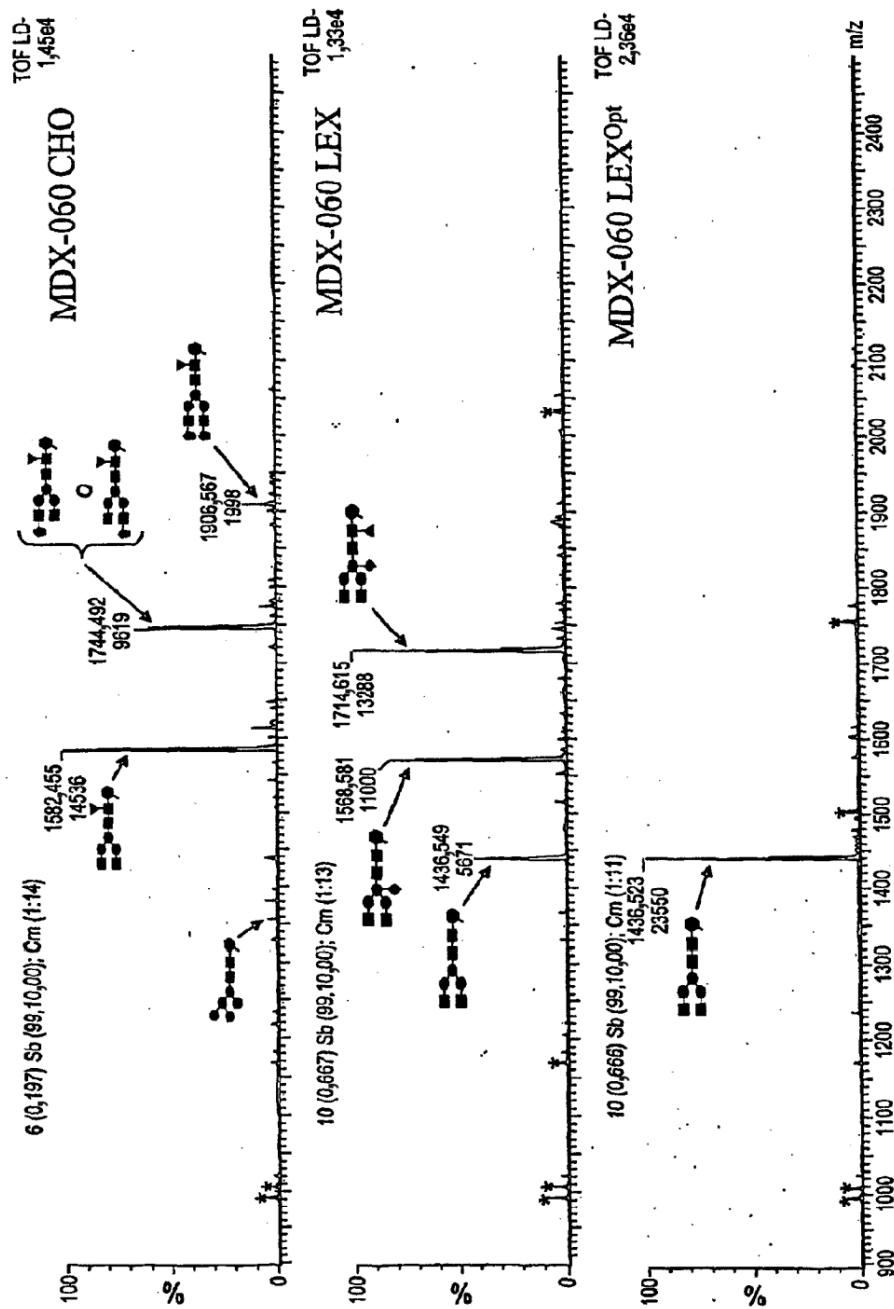


Fig. 14

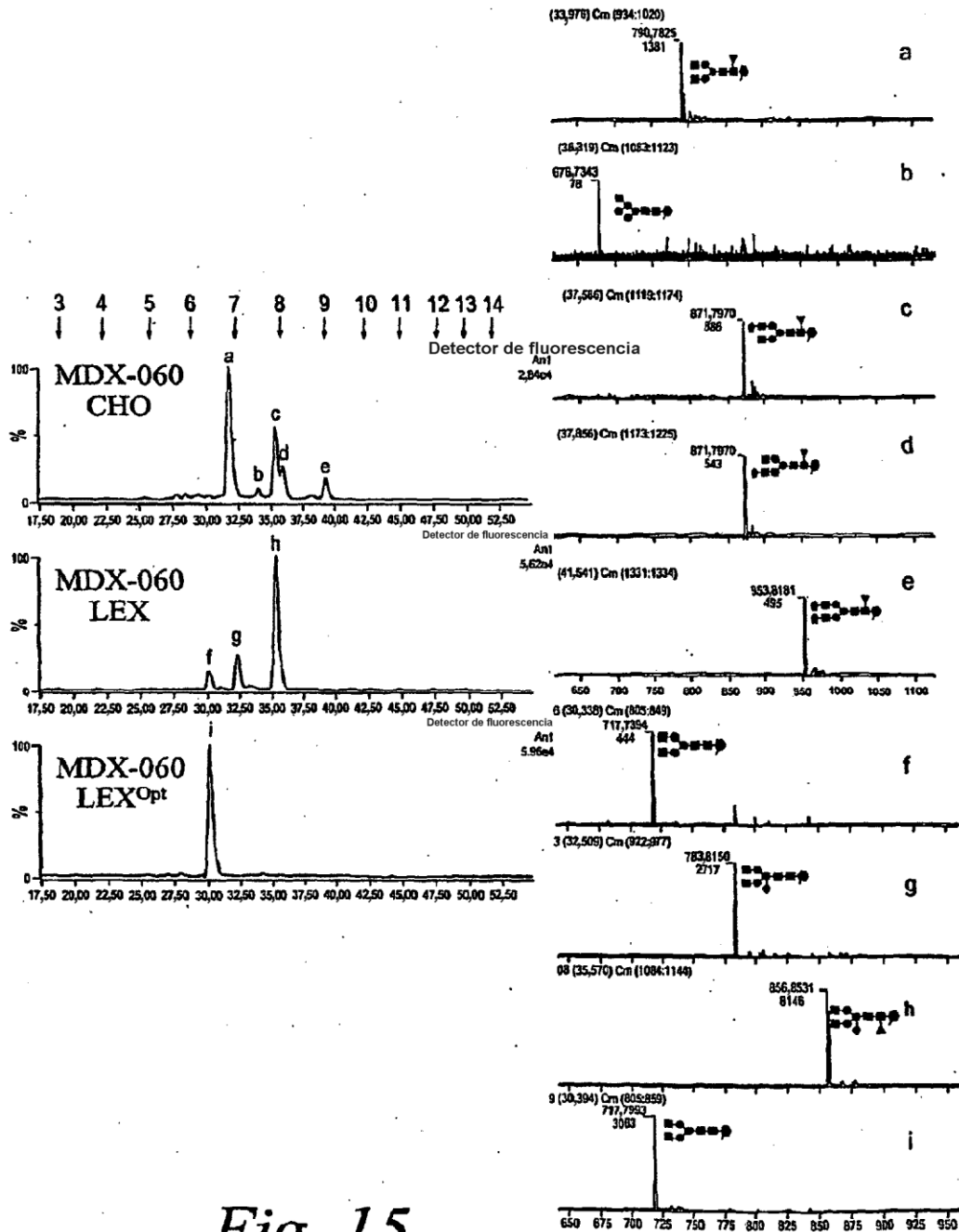
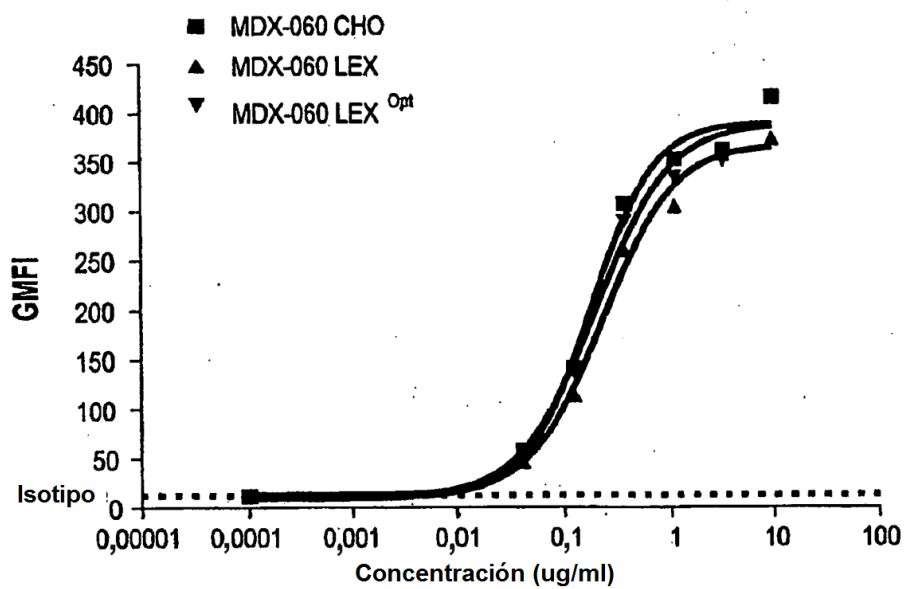
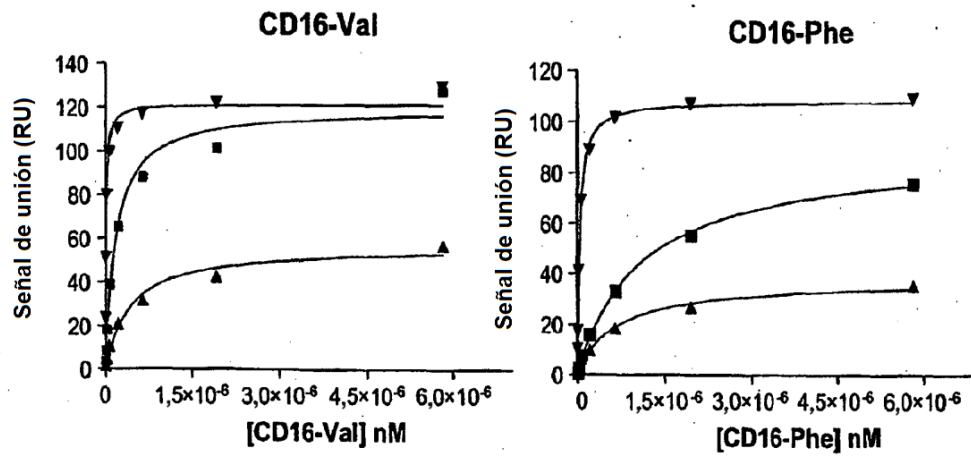


Fig. 15

*Fig. 16*



	Constantes de unión (nM)		
FcR humano	MDX-060 CHO	MDX-060 LEX	MDX-060 LEX ^{Opt}
CD16-Val	177	427	12
CD16-Phe	1091	641	41

Fig. 17

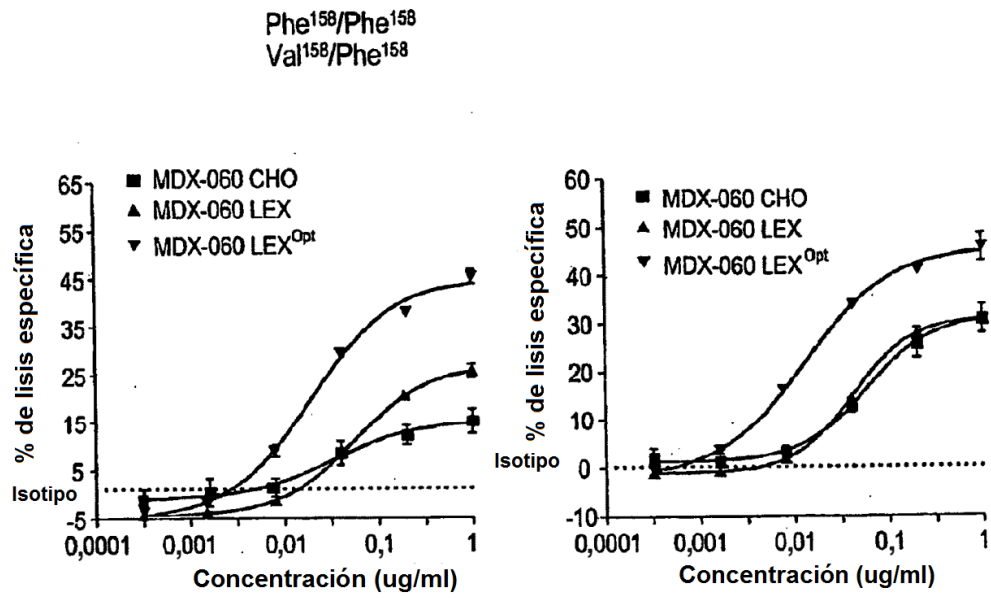
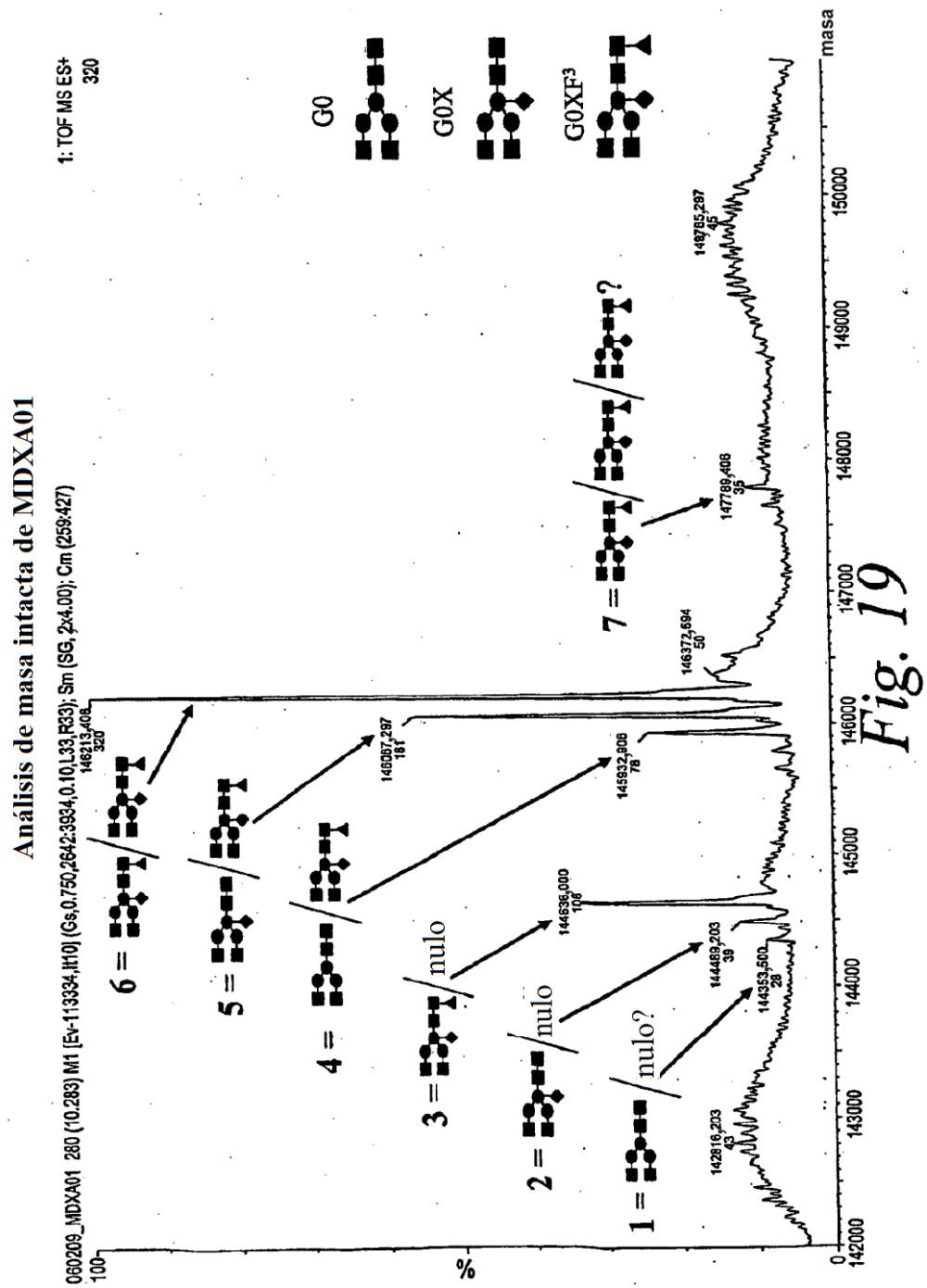


Fig. 18



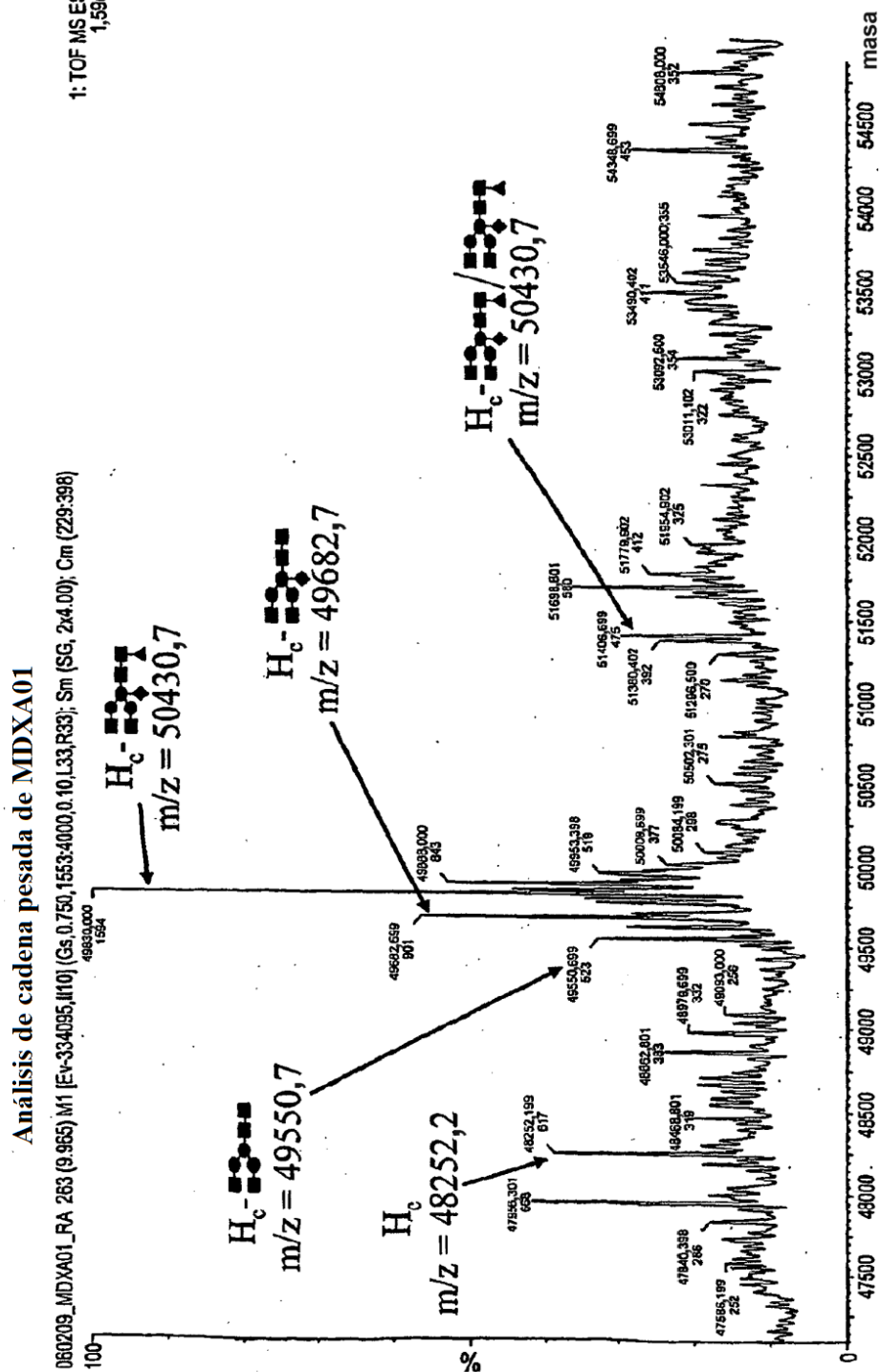


Fig. 20

Análisis de masa intacta de MDXA04

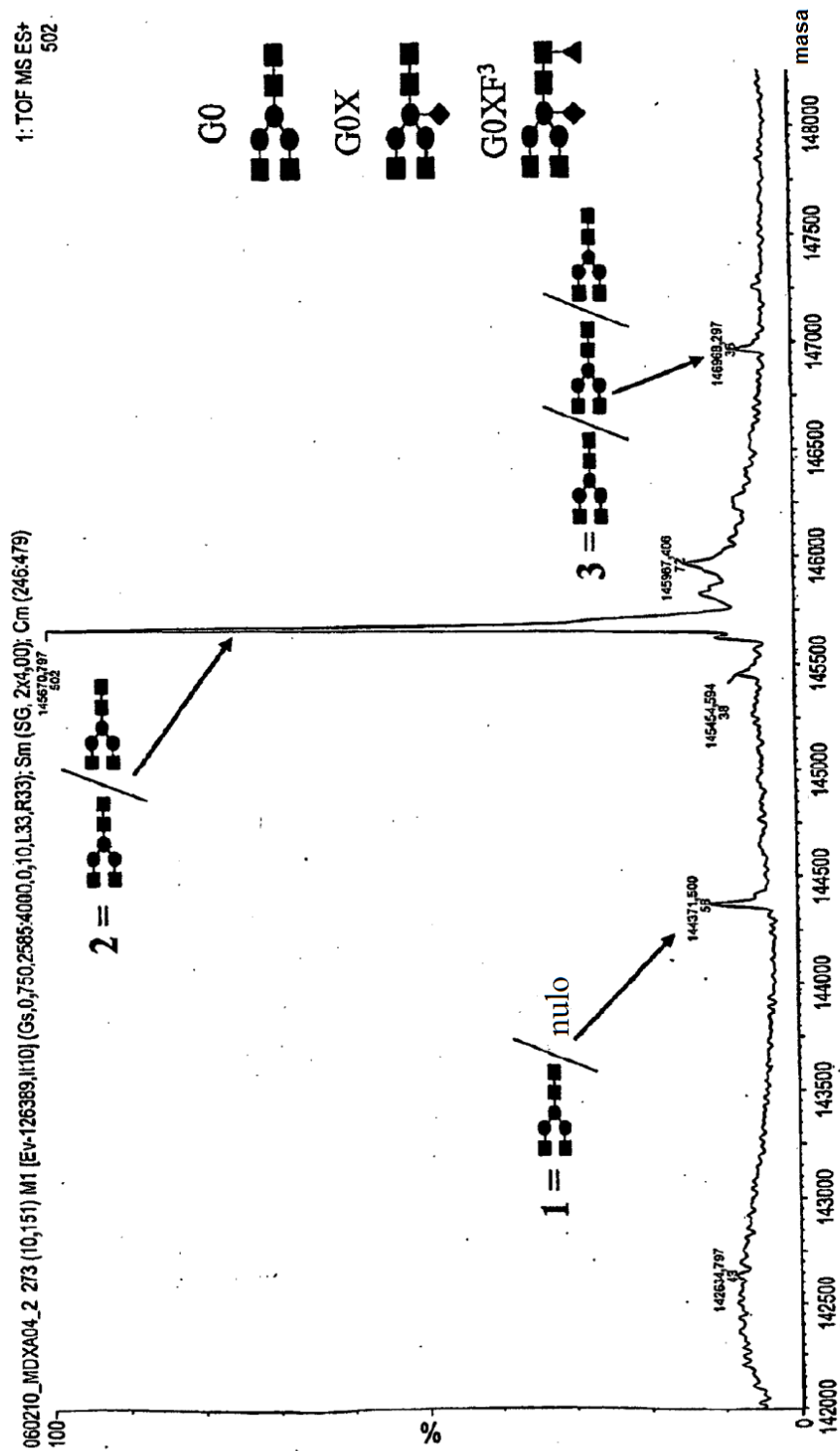


Fig. 21

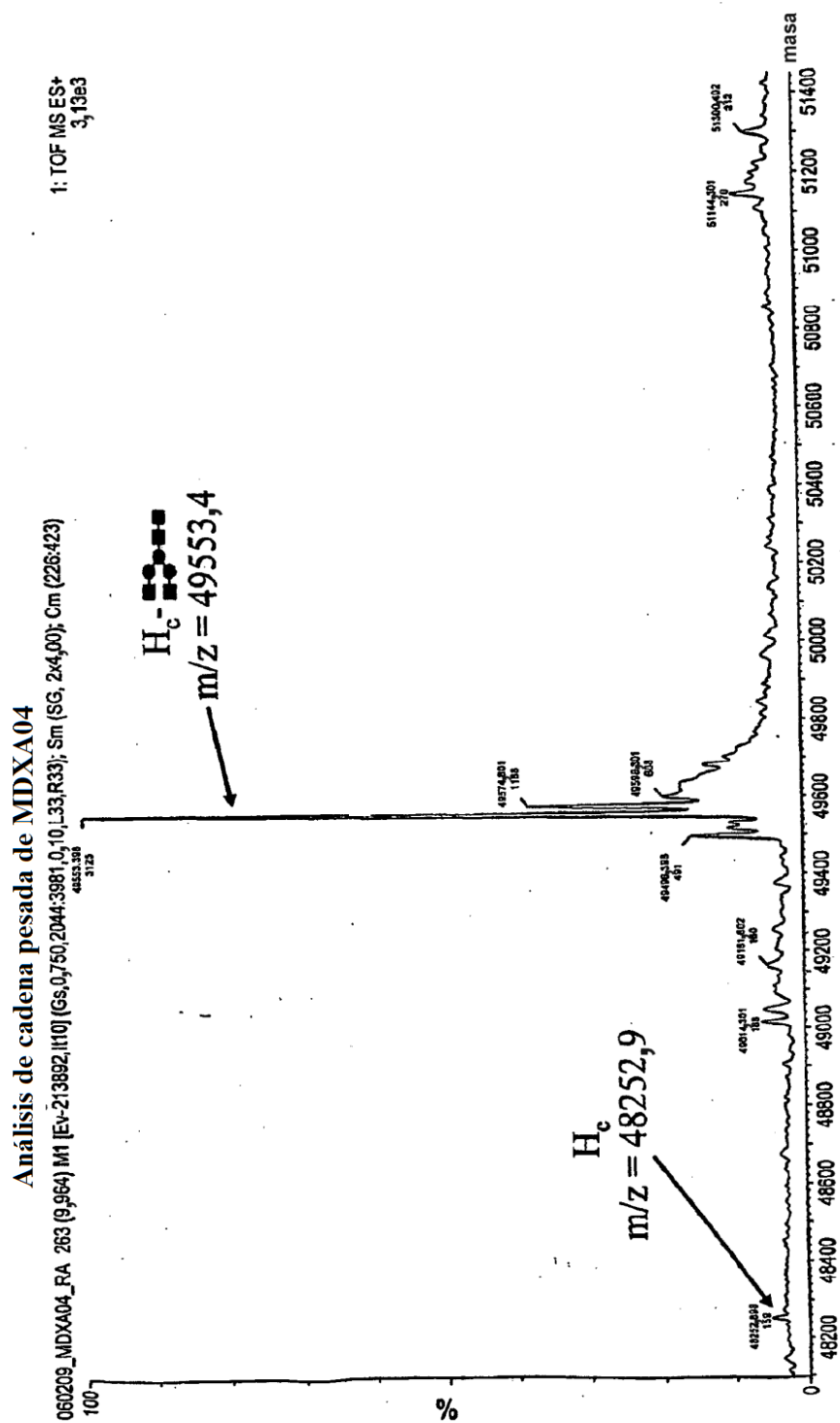


Fig. 22