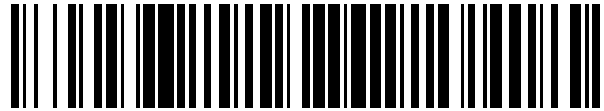


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 538**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2004 E 10009951 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 2289559**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo anti-CD70-fármaco y su uso para el tratamiento de cáncer y trastornos inmunológicos**

30 Prioridad:

20.02.2003 US 449055 P

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

28.04.2014

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**LAW, CHE-LEUNG;
WAHL, ALAN F.;
SCHOLLER, NATHALIE y
PESTANO, LINDA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 457 538 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

Conjugados de anticuerpo anti-CD70-fármaco y su uso para el tratamiento de cáncer y trastornos inmunológicos

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/449,055, presentada el 20 de febrero de 2003.

Antecedentes de la invención

CD70 es un miembro de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) de moléculas asociadas a membranas celulares y secretadas que son expresadas por una diversidad de tipos celulares normales y malignos. La secuencia primaria de aminoácidos (AA) de CD70 predice una proteína transmembrana de tipo II con su extremo carboxilo expuesto al exterior de las células, y su extremo amino localizado en el lado citosólico de la membrana plasmática (Bowman *et al.*, 1994, *J Immunol* 152:1756-61; Goodwin *et al.*, 1993, *Cell* 73:447-56). El CD70 humano está compuesto de un dominio citoplasmático de 20 AA, un dominio transmembrana de 18 AA, y un dominio extracitoplasmático de 155 AA con dos sitios potenciales de N-glicosilación (Bowman *et al.*, anteriormente mencionado; Goodwin *et al.*, anteriormente mencionado). La inmunoprecipitación específica de células que expresan CD70 marcadas con radioisótopos mediante anticuerpos anti-CD70 produce polipéptidos de 29 y 50 kDa (Goodwin *et al.*, anteriormente mencionado; Hintzen *et al.*, 1994, *J Immunol* 152:1762-73). Basándose en su homología respecto de TNF- α y TNF- β , en especial en las cadenas estructurales C, D, H e I, se predice una estructura trimérica para CD70 (Petsch *et al.*, 1995, *Mol Immunol* 32:761-72).

Los estudios inmunohistológicos originales revelaron que CD70 se expresa en las células B de los centros germinales y en pocas células T en amígdalas, piel, e intestino (Hintzen *et al.*, 1994, *Int Immunol* 6:477-80). Posteriormente, se informó que CD70 se expresa en la superficie celular de linfocitos T y B recién activados por antígenos, y su expresión decae tras la retirada de la estimulación antigénica (Lens *et al.*, 1996, *Eur J Immunol* 26:2964-71; Lens *et al.*, 1997, *Immunology* 90:38-45). En el sistema linfoide, las células citotóxicas (Orengo *et al.*, 1997, *Clin Exp Immunol* 107:608-13) y las células dendríticas periféricas maduras de ratón (Akiba *et al.*, 2000, *J Exp Med* 191:375-80) también expresan CD70. En los linajes que no son linfoides, se ha detectado CD70 en las células epiteliales medulares del timo (Hintzen *et al.*, 1994, anteriormente mencionado; Hishima *et al.*, 2000, *Am J Surg Pathol* 24:742-46).

Además de la expresión en células normales, se ha informado de la expresión de CD70 en diferentes tipos de cánceres, que incluyen linfomas, carcinomas, y tumores de origen neural. En las células B malignas, se ha informado que un 71% de los linfomas de células B grandes difusos, un 33% de los linfomas foliculares, un 25% de los linfomas del manto, y un 50% de los B-CLL expresan CD70 (Lens *et al.*, 1999, *Br J Haematol* 106:491-503). CD70 se expresa con frecuencia junto con otros marcadores de activación linfoides en las células malignas de Hodgkin y de Reed-Sternberg de la enfermedad de Hodgkin (Gruss y Kadin, 1996, *Baillieres Clin Haematol* 9:417-46). Un informe demuestra la expresión de CD70 en un 88% (7 de 8 casos) de carcinomas tímicos y un 20% (1 de 5 casos) de timomas atípicos (Hishima *et al.*, 2000, anteriormente mencionado). El segundo tipo de carcinoma en el que se ha detectado CD70 es el carcinoma nasofaríngeo. Un estudio informa de la presencia de CD70 en el 80% (16 de 20 casos) de biopsias de tumores congeladas rápidamente obtenidas de carcinomas nasofaríngeos indiferenciados (Agathangelou *et al.*, 1995, *Am J Pathol* 147:1152-60). También se ha detectado CD70 en células de tumores cerebrales, en especial en líneas celulares de gliomas, gliomas humanos sólidos, y meningiomas (Held-Feindt y Mentlein, 2002, *Int J Cancer* 98:352-56; Wischusen *et al.*, 2002, *Can Res* 62:2592-99).

Se ha propuesto que los virus transformantes, que incluyen el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus de la leucemia T humana 1 (HTLV-1) pueden inducir CD70 en células tales como las células epiteliales, que normalmente no expresan CD70 (Agathangelou *et al.*, anteriormente mencionado; Stein *et al.*, 1989, Oxford University Press, pág. 446). Por lo tanto, la expresión de CD70 en las células B malignas podría ser un reflejo de una transformación oncogénica (Lens *et al.*, 1999, anteriormente mencionado). Además, debido a que la expresión de CD70 se induce en las células B tras el encuentro con un antígeno (Maurer *et al.*, 1990, *Eur J Immunol* 20:2679-84; Lens *et al.*, 1996, anteriormente mencionado), la expresión estable de CD70 podría reflejar una estimulación antigénica prolongada. Se ha postulado que esto ocurre en los linfomas no Hodgkin foliculares basándose en una hipermutación somática en desarrollo (Bahler *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6770-74; Bahler *et al.*, 1992, *Cancer Res* 52:suppl. 5547S-51S).

El receptor de CD70 es CD27, una proteína transmembrana de tipo I glicosilada de alrededor de 55 kDa (Goodwin *et al.*, 1993, *Cell* 73:447-56; Hintzen *et al.*, 1994, anteriormente mencionado). CD70 se denomina a veces CD27L. CD27, que existe en forma de un homodímero en la superficie celular (Gravestien *et al.*, 1993, *Eur J Immunol* 23:943-50), es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF tal como se define por las repeticiones ricas en cisteína de alrededor de 40 aminoácidos en el dominio extracelular (Smith *et al.*, 1990, *Science* 248:1019-23; Locksley *et al.*, 2001, *Cell* 104:487-501). CD27 se expresa típicamente en los timocitos, en las células citotóxicas, y en las células T y B (Hintzen *et al.*, 1994, *Immunol Today* 15:307-11; Lens *et al.*, 1998, *Semin Immunol* 10:491-99). En las células T en reposo, CD27 se expresa de manera constitutiva, aunque el desencadenamiento antigénico

estimula adicionalmente la expresión de CD27 (de Jong *et al.*, 1991, *J Immunol* 146:2488-94; Hintzen *et al.*, 1993, *J Immunol*. 151:2426-35). Además, el desencadenamiento de las células T a través de su complejo antígeno-receptor de células T solo o en combinación con la molécula secundaria CD28 libera CD27 soluble de las células T activadas (Hintzen *et al.*, 1991, *J Immunol* 147:29-35). Las células B sin exposición previa no expresan CD27, pero su expresión se induce y, al contrario de CD70, se mantiene tras el desencadenamiento antigénico de las células B (Jacquot S *et al.*, 1997 *J Immunol* 159:2652-57; Kobata T *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11249-53).

En contraste notable con la expresión limitada de CD27 y CD70 en células normales de linaje B, tanto CD27 como CD70 se co-expresan frecuentemente en muchos linfomas no Hodgkin y leucemias de células B. Esto podría conducir potencialmente a interacciones funcionales CD27-CD70 en estas células en forma de un bucle autocrino, lo que daría como resultado la señalización de CD27 y la proliferación inducida por CD70, por lo que se proporcionaría una ventaja de crecimiento a las células malignas (Lens *et al.*, 1999, anteriormente mencionado).

Los datos disponibles apoyan un modelo en el que la unión de CD27 en los linfocitos activados mediante CD70 comunica señales a las células que expresan CD27, lo que incluye señales co-estimuladoras en las células T, B, y citotóxicas (véase, p.ej., Goodwin *et al.*, anteriormente mencionado; Hintzen *et al.*, 1995, *J Immunol* 154:2612-23; Oshima *et al.*, 1998, *Int Immunol* 10:517-26; Smith *et al.*, anteriormente mencionado; Van Lier *et al.*, 1987, *J Immunol* 139:1589-96; Gravestain *et al.*, 1995, *Int Immunol* 7:551-7; Tesselaar *et al.*, 1997, *J Immunol* 159:4959-65; Jacquot *et al.*, anteriormente mencionado; Agematsu *et al.*, 1998, *Blood* 91:173-80; Kobata *et al.*, anteriormente mencionado; Agematsu *et al.*, 1997, *Eur J Immunol* 27:2073-79; Sugita *et al.*, 1992, *J Immunol* 149:1199-1203; Orenge *et al.*, 1997, *Clin Exp Immunol* 107:608-13). Se ha demostrado que los anticuerpos contra CD70 murino y humano inhiben dichas actividades, supuestamente bloqueando la interacción CD70/CD27 (Hintzen *et al.*, 1994, anteriormente mencionado; Hintzen *et al.*, 1995, anteriormente mencionado; Oshima *et al.*, anteriormente mencionado).

Hay disponible una información limitada sobre la modulación de las funciones celulares por medio de la señalización de CD70 tras la interacción CD70/CD27, es decir, la "señalización inversa". Algunos anticuerpos de CD70 tienen la capacidad de aumentar la proliferación de las células T cuando se presentan a las células T que expresan CD70, entrecruzados con un anticuerpo secundario o inmovilizados en placas de cultivo de tejidos (Bowman *et al.*, 1994, *J Immunol* 152:1756-61; Brugnoli, 1997, *Immunol Lett* 55:99-104). Tal "señalización inversa" se ha descrito también en un subgrupo de células de leucemia linfocítica B crónica (B-CLL), y CD70 puede funcionar como receptor para transducir señales para facilitar la proliferación de células B-CLL purificadas estimuladas mediante PMA (Lens *et al.*, 1999, anteriormente mencionado). Estas observaciones sugieren situaciones en las que la unión de CD27 y CD70 puede dar como resultado la transmisión de señales agonistas a las células que expresan CD27 y CD70.

El papel de la co-estimulación de CD70/CD27 en enfermedades autoinmunitarias mediadas por células se ha investigado en un modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) (Nakajima *et al.*, 2000, *J Neuroimmunol* 109:188-96). La administración in vivo de un mAb particular anti-CD70 de ratón (clon FR-70) inhibió notablemente el inicio de la EAE inhibiendo la producción de TNF- α inducida por el antígeno sin afectar a la sensibilización de las células T, la producción de Ig o el equilibrio de células T_{H1}/T_{H2}. Sin embargo, tal tratamiento tuvo poca eficacia en la enfermedad establecida. Se ha informado que la expresión de CD70 en las células T se estimuló mediante TNF- α e IL-12, y se inhibió mediante IL4 (Lens *et al.*, 1998, anteriormente mencionado). Así, las interacciones célula T-célula T mediadas por CD70/CD27 pueden desempeñar un papel en la estimulación de las respuestas inmunológicas mediadas por T_{H1} más que en las respuestas mediadas por T_{H2}. En apoyo de esta hipótesis, el mAb anti-CD70 de ratón FR-70 es también eficaz en la inhibición de la artritis inducida por colágeno mediada por T_{H1} (Nakajima *et al.*, 2000, anteriormente mencionado). En contraste, el mismo mAb anti-CD70 de ratón no mostró eficacia en la modulación del lupus en ratones NZB/NZW F1 y en la infección experimental por *Leishmania major* en ratones BALB/c susceptibles, las cuales son predominantemente respuestas autoinmunitarias mediadas por T_{H2} (Nakajima *et al.*, 1997, *J Immunol* 158, 1466-72; Akiba *et al.*, 2000, *J Exp Med* 191:375-380).

Todavía no se ha investigado el papel de CD70 en la enfermedad injerto contra huésped aguda (aGVHD), otra respuesta inmunológica mediada por T_{H1}. La GVHD es una consecuencia importante y a menudo letal de la terapia de trasplante alogénico de médula ósea (BMT) que sucede cuando hay presentes diferencias de antígenos de histocompatibilidad entre el donante de médula ósea y el receptor del trasplante (den Haan *et al.*, 1995, *Science* 268:1476). La GVHD está provocada por células T maduras presentes en la médula trasplantada, así como otras poblaciones celulares menores (Giralt y Champlin, 1994, *Blood* 84:3603). Es digno de mención que el CD70 se ha detectado *in vivo* en células CD4+ en afecciones caracterizadas por una reacción alogénica, como en casos de injerto de células T maternas en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (Brugnoli *et al.*, *Immunol Lett* 55:99-104). La profilaxis de GVHD se lleva a cabo mediante agentes inmunosupresores de todas las células T, tales como ciclosporina, corticoesteroides, o metotrexato. Además de la carencia de especificidad, estos agentes están asociados también a efectos secundarios adversos considerables. Para limitar estos efectos indeseables y la alteración de las funciones normales de las células T, son muy necesarias otras intervenciones terapéuticas basadas en la selección precisa de las células T que participan directamente en el alo-reconocimiento y en el rechazo de injertos.

CD70 es un objetivo potencialmente útil para la inmunoterapia guiada por anticuerpos. Tal como se indicó anteriormente, CD70 tiene un patrón de expresión limitado en las células normales: la expresión de CD70 se limita

en gran parte a las células T y B recién activadas por el antígeno en condiciones fisiológicas, y su expresión se inhibe cuando cesa la estimulación antigénica. Se cree que el papel clave de CD70 es facilitar la diferenciación de las células plasmáticas y contribuir a la generación y al mantenimiento de la memoria de las células T a largo plazo. Además, las pruebas de los modelos animales sugieren que la interacción CD70/CD27 no regulada puede contribuir a los trastornos inmunológicos, y, en los humanos, los datos experimentales han apuntado también hacia la regulación anormal potencial de la ruta de CD70/CD27 en los trastornos inmunitarios mediados por T_H1 tales como, p.ej., artritis reumatoide, psoriasis, y esclerosis múltiple. Es de interés particular que CD70 se exprese en una diversidad de células transformadas que incluyen las células de linfoma B, las células de Hodgkin y de Reed-Sternberg, las células malignas de origen neural, y varios carcinomas.

Varios grupos han demostrado el efecto inhibitor del mAb anti-CD70 tanto en modelos *in vitro* de activación de linfocitos como en modelos animales de respuestas mediadas por T_H1. Se ha centrado la atención en el uso de anticuerpos para bloquear la ruta de co-estimulación de CD70/CD27 para conseguir la eficacia terapéutica. Sin embargo, el defecto principal de tal aproximación es el gran número de receptores de señalización, p.ej., la ruta co-estimuladora de CD28/CD80/CD86, que se sabe que participa en las enfermedades inmunológicas. En consecuencia, el bloqueo de una ruta de señalización específica puede tener solamente un impacto mínimo sobre el desarrollo de la enfermedad. Esto está apoyado por las observaciones de que el mAb anti-CD70 solamente puede inhibir parcialmente la activación de las células T *in vitro* inducida mediante células estimuladoras alogénicas (Hintzen *et al.*, 1995, anteriormente mencionado) y un mAb anti-CD70 no mostró eficacia terapéutica en EAE una vez que la enfermedad estaba establecida (Nakajima *et al.*, 2000, anteriormente mencionado).

Así, existe la necesidad en la técnica de desarrollar una aproximación para eliminar o inhibir el crecimiento de las células que expresan CD70 implicadas en cánceres y/o enfermedades inmunológicas por medios distintos o adicionales al bloqueo de la interacción CD70/CD27. Debido a que CD70 se expresa en la superficie de células dendríticas maduras que presentan antígenos, células T activadas, y células B activadas, los agentes que pueden seleccionar como objetivo e inhibir o eliminar las células CD70⁺ pueden resultar eficaces en la eliminación de las células presentadoras de antígenos que presentan autoantígenos y de las células T o B activadas autorreactivas causales, así como de las células tumorales que expresan CD70.

Las aproximaciones que se han usado para incrementar la eficacia terapéutica de los anticuerpos incluyen el radiomarcado y la combinación con la quimioterapia; sin embargo, estas aproximaciones están asociadas a efectos secundarios indeseables. Por ejemplo, la terapia con isótopos está asociada a mielosupresión (Witzig, 2001, *Cancer Chemother Pharmacol* 48 (Supl. 1):S91-5), y la terapia de combinación con anticuerpos y agentes quimioterápicos está asociada a la inmunosupresión. Además, las sustancias marcadas isotópicamente son difíciles de producir, y los pacientes experimentan a menudo una recidiva tras el tratamiento inicial con las sustancias marcadas isotópicamente.

Por lo tanto, existe la necesidad de ADCs anti-CD70 que estén contruidos de tal manera que sean capaces de ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor clínicamente útil sobre las células que expresan CD70, en particular sin ejercer efectos indeseables sobre las células que no expresan CD70. Tales compuestos serían agentes terapéuticos útiles contra los cánceres que expresan CD70 o trastornos inmunitarios que son mediados por células que expresan CD70.

Breve resumen de la invención

La presente descripción proporciona conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs) y derivados de ADC y métodos referentes al uso de tales conjugados para tratar trastornos inmunológicos y cánceres que expresan CD70. El anticuerpo, u otro resto que se dirige a la diana del ADC, se une a CD70. El fármaco conjugado con el anticuerpo o con el resto que se dirige a la diana ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células que expresan CD70 para tratar o prevenir la recidiva de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD70.

En un aspecto, se proporcionan métodos para el tratamiento de un cáncer que expresa CD70 en un sujeto. Los métodos generalmente incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado anticuerpo-fármaco. El conjugado anticuerpo-fármaco incluye un anticuerpo que se une a CD70 ("anticuerpo CD70"). El anticuerpo está conjugado con un fármaco que es un agente citotóxico o citostático. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2.

En otras realizaciones, el anticuerpo se une a CD70 y compite por la unión a CD70 con el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2. Tal anticuerpo CD70 puede incluir al menos una región polipeptídica seleccionada de (a) una región H1 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:6; (b) una región H2 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 8; una región H3 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:10; (d) una región L1 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:16; (e) una región L2 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:18; (f) una región L3 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:20; (g) una región H1 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias

respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:26; (h) una región H2 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:28; (i) una región H3 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:30; (j) una región L1 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:36; (k) una región L2 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:38; y (l) una región L3 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:40.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo CD70 incluye las regiones H1, H2, y H3 de (a), (b), y (c) (anteriormente mencionados); o las regiones H1, H2, y H3 de (g), (h), e (i) (anteriormente mencionados). En las realizaciones adicionales, las regiones H1, H2, H3, L1, L2 y L3 del anticuerpo CD70 incluyen regiones polipeptídicas que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°:6, SEQ ID N°:8, SEQ ID N°:10; SEQ ID N°:16, SEQ ID N°:18, y SEQ ID N°:20, respectivamente.

En las realizaciones adicionales, las regiones H1, H2, y H3 corresponden a (a), (b), y (c) (anteriormente mencionados) y las regiones L1, L2, y L3 corresponden a (d), (e), y (f) (anteriormente mencionados), respectivamente; o las regiones H1, H2, y H3 corresponden a (g), (h), e (i) (anteriormente mencionados) y las regiones L1, L2, y L3 corresponden a (j), (k), y (l) (anteriormente mencionados). En las realizaciones adicionales, el anticuerpo CD70 comprende una región variable de la cadena pesada que tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:2 o SEQ ID N°: 22. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo CD70 puede tener además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:2 o SEQ ID N°:22.

Aún en otras realizaciones, la región variable de la cadena pesada tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de SEQ ID N°:2 o SEQ ID N°:22, y la región variable de la cadena ligera tiene al menos un 80% de identidad de secuencias respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:12 o SEQ ID N°:32. La región variable de la cadena ligera puede tener además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:12 o SEQ ID N°:32.

En las realizaciones ilustrativas, el conjugado anticuerpo-fármaco es 1F6-val-cit-AFP, 1F6-val-cit-MMAF, 1F6-val-cit-MMAE, 2F2-val-cit-AFP, 2F2-val-cit-MMAF, y 2F2-val-cit-MMAE.

El anticuerpo CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo CD70 es un anticuerpo quimérico que tiene una región constante humana. El anticuerpo CD70 puede ser monovalente o polivalente.

Los agentes citotóxicos adecuados pueden ser, por ejemplo, una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enediina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide, y un alcaloide de la vinca. En las realizaciones específicas, el agente citotóxico es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1, o netropsina. Otros agentes citotóxicos adecuados incluyen agentes anti-tubulina, tales como una auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina, o una dolastatina. En las realizaciones específicas, el agente antitubulina es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicinas, colcimida, estramustina, cernadotina, discodermolida, maitansina, DM-1, o eleuterobina.

En los conjugados anticuerpo-fármaco, el anticuerpo se puede conjugar al agente citotóxico directamente o por medio de un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible es típicamente susceptible a la escisión en las condiciones intracelulares. Los enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como una proteasa lisosómica o una proteasa endosómica. En las realizaciones ejemplares, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como un enlazador de valina-citrulina (val-cit) o fenilalanina-lisina (phe-lys). Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables a un pH menor de 5,5, tal como un enlazador de hidrazona. Los enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen los enlazadores disulfuro.

Un conjugado anticuerpo-fármaco se puede dirigir a células que expresan CD70, tales como, por ejemplo, las de un tumor renal, un linfoma de células B, un carcinoma tímico, un carcinoma nasofaríngeo, o un tumor cerebral. El tumor renal puede ser, por ejemplo, un carcinoma de células renales. El tumor cerebral puede ser, por ejemplo, un glioma, un glioblastoma, o un meningioma. El conjugado anticuerpo-fármaco se puede administrar a seres humanos o a animales no humanos.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para tratar un trastorno inmunológico. Los métodos generalmente incluyen administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo al que se une CD70. El anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico o un agente inmunosupresor. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2.

En otras realizaciones, el anticuerpo se une a CD70 y compete por unirse a CD70 con el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2. El anticuerpo CD70 puede incluir al menos una región polipeptídica seleccionada de (a) una región H1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:6; (b) una región H2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:8; (c) una región H3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:10; (d) una región L1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:16; (e) una región L2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:18; (f) una región L3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:20; (g) una región H1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:26; (h) una región H2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:28; (i) una región H3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:30; (j) una región L1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:36; (k) una región L2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:38; y (l) una región L3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:40.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo CD70 incluye las regiones H1, H2 y H3 de (a), (b), y (c) (*supra*); o las regiones H1, H2 y H3 de (g), (h) e (i) (*supra*), respectivamente. En realizaciones adicionales, las regiones H1, H2, H3, L1, L2 y L3 del anticuerpo CD70 incluyen regiones polipeptídicas que tienen las secuencias de aminoácidos enunciadas en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:20, respectivamente.

En realizaciones adicionales, las regiones H1, H2 y H3 corresponden a (a), (b) y (c) (*supra*) y las regiones L1, L2 y L3 corresponden a (d), (e) y (f) (*supra*), respectivamente; o las regiones H1, H2 y H3 corresponden a (g), (h) e (i) (*supra*) y las regiones L1, L2 y L3 corresponden a (j), (k) y (l) (*supra*), respectivamente. En realizaciones adicionales, el anticuerpo CD70 comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:22. La región variable de cadena pesada de CD70 también puede tener la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:22.

Todavía en otras realizaciones, la región variable de cadena pesada tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:22, y la región variable de cadena ligera tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:32. La región variable de cadena ligera también puede tener la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:32.

En realizaciones ilustrativas, el conjugado anticuerpo-fármaco es 1F6-val-cit-AFP, 1F6-val-cit-MMAF, 1F6-val-cit-MMAE, 2F2-val-cit-AFP, 2F2-val-cit-MMAF y 2F2-val-cit-MMAE.

El anticuerpo CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo CD70 es un anticuerpo quimérico que tiene una región constante humana. El anticuerpo CD70 puede ser monovalente o polivalente.

Los agentes citotóxicos adecuados pueden ser, por ejemplo, una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enedina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide, y un alcaloide de la vinca. En realizaciones específicas, el fármaco es un agente citotóxico y es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1, o netropsina. Otros agentes citotóxicos adecuados incluyen los agentes anti-tubulina, tales como auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de bacatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina, o una dolastatina. En realizaciones específicas, el agente antitubulina es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicinas, colcemid, estramustina, cemadotina, discodermolida, maitansina, DM-1 o eleuterobina.

Los agentes inmunosupresores adecuados incluyen, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil, metotrexato, cortisol, aldosterona, dexametasona, un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrieno.

En los conjugados anticuerpo-fármaco, el anticuerpo puede estar conjugado con el agente citotóxico o el agente inmunosupresor ya sea directamente o a través de un enlazador. Enlazadores adecuados incluyen por ejemplo, los enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible es típicamente susceptible a la escisión en condiciones intracelulares. Los enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como una proteasa lisosómica o una proteasa endosómica.

En realizaciones ilustrativas, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como un enlazador valina-citrulina (val-cit) o un enlazador fenilalanina-lisina (phe-lys). Otros enlazadores adecuados incluyen los enlazadores

escindibles hidrolizables a un pH menor que 5,5, tales como un enlazador hidrazona. Enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen enlazadores disulfuro.

El ADC puede ser dirigido a células de un trastorno inmunológico, como, por ejemplo, trastornos inmunológicos mediados por Th1. Los trastornos inmunológicos mediados por Th1 incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad injerto contra huésped aguda. Otros trastornos inmunológicos incluyen, por ejemplo, un trastorno de linfocitos B activados. El sujeto puede ser un ser humano o animal inferior.

Todavía en otro aspecto, se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco. Los conjugados anticuerpo fármaco incluyen un anticuerpo que se une a CD70. El anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico o un agente inmunosupresor. El conjugado anticuerpo-fármaco puede ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre una línea de células cancerosas que expresan CD70, y/o un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre una célula inmunológica que expresa CD70.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2. En otras realizaciones, el anticuerpo se une a CD70 y compite con el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2 por unirse a CD70. El anticuerpo CD760 puede incluir al menos una región polipeptídica seleccionada de (a) una región H1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:6; (b) una región H2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:8; (c) una región H3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:10; (d) una región L1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:16; (e) una región L2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:18; (f) una región L3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:20; (g) una región H1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:26; (h) una región H2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:28; (i) una región H3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:30; (j) una región L1 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:36; (k) una región L2 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:38; y (l) una región L3 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:40.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo CD70 incluye las regiones H1, H2 y H3 de (a), (b), y (c) (*supra*); o las regiones H1, H2 y H3 de (g), (h) e (i) (*supra*), respectivamente. En realizaciones adicionales, las regiones H1, H2, H3, L1, L2 y L3 del anticuerpo CD70 incluyen regiones polipeptídicas que tienen las secuencias de aminoácidos enunciadas en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:20, respectivamente.

En realizaciones adicionales, las regiones H1, H2 y H3 corresponden a (a), (b) y (c) (*supra*) y las regiones L1, L2 y L3 corresponden a (d), (e) y (f) (*supra*), respectivamente; o las regiones H1, H2 y H3 corresponden a (g), (h) e (i) (*supra*) y las regiones L1, L2 y L3 corresponden a (j), (k) y (l) (*supra*), respectivamente. En realizaciones adicionales, el anticuerpo CD70 comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:22. La región variable de cadena pesada de CD70 también puede tener la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:22.

Todavía en otras realizaciones, la región variable de cadena pesada tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:22, y la región variable de cadena ligera tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:32. La región variable de cadena ligera también puede tener la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:32.

En realizaciones ilustrativas, el conjugado anticuerpo-fármaco es 1F6-val-cit-AFP, 1F6-val-cit-MMAF, 1F6-val-cit-MMAE, 2F2-val-cit-AFP, 2F2-val-cit-MMAF y 2F2-val-cit-MMAE.

El anticuerpo CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo CD70 es un anticuerpo quimérico que tiene una región constante humana. El anticuerpo CD70 puede ser monovalente o polivalente.

Los agentes citotóxicos adecuados pueden ser, por ejemplo, una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enedíina, una lexitropina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide, y un alcaloide de la vinca. En realizaciones específicas, el fármaco es un agente citotóxico y es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1, o netropsina. Otros agentes citotóxicos adecuados incluyen los agentes anti-tubulina, tales como auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de bacatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina, o una dolastatina. En realizaciones específicas, el

agente antitubulina es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicinas, colcemid, estramustina, cemadotina, discodermolida, maitansina, DM-1 o eleuterobina.

5 Los agentes inmunosupresores adecuados incluyen, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil, metotrexato, cortisol, aldosterona, dexametasona, un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrieno.

10 En los conjugados anticuerpo-fármaco, el anticuerpo puede estar conjugado con el agente citotóxico o el agente inmunosupresor ya sea directamente o a través de un enlazador. Enlazadores adecuados incluyen por ejemplo, los enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible es típicamente susceptible a la escisión en condiciones intracelulares. Los enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como una proteasa lisosómica o una proteasa endosómica.

15 Los conjugados de anticuerpo-fármaco se pueden dirigir a una célula cancerosa que expresa CD70, tal como un carcinoma de células renales, un linfoma de células B, o un glioblastoma. El conjugado de anticuerpo-fármaco también se puede dirigir a células inmunológicas que expresan CD70, tales como una célula T activada, una célula B activada, o una célula dendrítica madura.

20 En otros aspectos adicionales, se proporcionan composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD70. Las composiciones farmacéuticas incluyen un conjugado anticuerpo-fármaco y al menos un ingrediente farmacéuticamente compatible. En un aspecto relacionado, se proporcionan equipos farmacéuticos. Los equipos incluyen un recipiente que contiene un conjugado anticuerpo-fármaco. El conjugado anticuerpo-fármaco está generalmente liofilizado. Los equipos pueden incluir además un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se puede entender más completamente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, los ejemplos no limitantes de las realizaciones específicas de la invención, y las figuras adjuntas.

25 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencias de cADN y de aminoácidos de V_L y V_H de 1F6. Se determinaron las secuencias codificantes y de aminoácidos para las regiones variables de la cadena ligera (V_L , los dos paneles superiores) y de la cadena pesada (V_H , los dos paneles inferiores) de 1F6. Se identificaron las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) para las V_L y V_H según los criterios descritos en Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Washington, D.C., US Department of Health and Public Services; Chothia y Lesk, 1987, *J Mol Biol* 196: 901-917. Los residuos de aminoácidos que corresponden a las CDRs están subrayados. Se identifica que los péptidos señal para las V_L y V_H están en los residuos -20 a 0 y -19 a 0, respectivamente.

35 Figura 2: Secuencias de cADN y de aminoácidos de V_L y V_H de 2F2. Se determinaron las secuencias codificantes y de aminoácidos para las regiones variables de la cadena ligera (V_L , los dos paneles superiores) y de la cadena pesada (V_H , los dos paneles inferiores) de 2F2. Se identificaron las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) para las V_L y V_H según los criterios descritos en Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Washington, D.C., US Department of Health and Public Services; Chothia y Lesk, 1987, *J Mol Biol* 196: 901-917. Los residuos de aminoácidos que corresponden a las CDRs están subrayados. Se identifica que los péptidos señal para las V_L y V_H están en los residuos -20 a 0 y -19 a 0, respectivamente.

40 Figura 3: Comparación de secuencias de aminoácidos entre las CDRs de 1F6 y de 2F2. Las secuencias de aminoácidos de las CDRs de 1F6 y 2F2 están alineadas. Los residuos subrayados representan las sustituciones conservativas, y los residuos recuadrados y en cursiva representan las sustituciones divergentes.

45 Figura 4: Expresión de CD70 en líneas celulares hematológicas. Se determinó la expresión de CD70 en la superficie de un panel de líneas celulares hematológicas de diferentes orígenes tisulares y fuentes mediante citometría de flujo. La expresión de CD70 se expresó como la proporción de unión entre el mAAb anti-CD70 y la IgG de control.

50 Figura 5: Efecto de los ADCs anti-CD70 sobre la proliferación de líneas celulares hematológicas transformadas. Se analizó un subgrupo de las líneas celulares CD70⁺ mostradas en la Figura 4 y la línea celular CD70⁻ Jurkat en cuanto a su sensibilidad hacia los ADCs de 1F6. Se añadieron dosis graduadas de ADCs de 1F6-vcMMAE, 1F6-vcAFP, o de la IgG de control sin unión (IgG) correspondiente a las células al comienzo del cultivo. Las células se expusieron a los ADCs continuamente durante un total de 96 horas. Se determinó la proliferación mediante un pulso de ³H-TdR durante las últimas 16 horas de incubación. Los paneles superiores muestran la respuesta de las líneas WSU-NHL y Jurkat. El panel inferior resume las respuestas de las líneas celulares ensayadas hacia 1F6-vcMMAE y 1F6-vcAFP en forma de CI₅₀s.

55 Figura 6: Análisis mediante la matriz de caracterización de cánceres (CPA) de la expresión del mensaje de CD70 en múltiples tipos de cáncer. La expresión de CD70 en 241 aislamientos tumorales y en los tejidos normales adyacentes correspondientes en un CPA se determinó mediante hibridación con una sonda de cADN de CD70. Hay

presentes trece tipos de tumores en la matriz, tal como se indica en la figura. Cada par de puntos representa una muestra tumoral (lado derecho, T) y el tejido normal correspondiente (lado izquierdo, N). Para algunos grupos de cADN, tal como se ejemplifica mediante el grupo de muestras recuadrado, la muestra de cADN del punto superior izquierdo procede del tejido normal, el del punto superior derecho del tumor metastásico, y el del punto inferior derecho del tumor primario. Los asteriscos indican pares de cADN en los que se detectó la sobreexpresión del transcrito de CD70 en el cADN del tumor (proporción tumor:normal > 2 veces, basándose en la intensidad de la hibridación).

Figura 7: Sobreexpresión de los transcritos de CD70 en carcinoma de células renales (RCC) detectada mediante PCR cuantitativa. Se comparó la expresión de CD70 en muestras de cADN de RCC con la detectada en una mezcla de 4 riñones normales mediante PCR cuantitativa mediante el uso de un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 y el método Δ Ct. Los números representan la proporción de expresión de transcrito de CD70 en RCC en comparación con la de los riñones normales.

Figuras 8A y B: Expresión de la proteína CD70 en cortes de tumores congelados de RCC. (A) Se determinó la unión del mAb anti-CD70 2F2 (columna derecha) y de una IgG de control (columna izquierda) a cortes de tumores congelados en serie procedentes de dos donantes de RCC mediante tinción inmunohistoquímica. Las microfotografías se tomaron a un aumento de 40X. (B) Se usó el mismo par de anticuerpos para teñir cortes de tejidos normales congelados en serie adyacentes al tumor obtenidos de los mismos donantes de RCC usados en (A).

Figuras 9A y B: Expresión de CD70 en líneas celulares de carcinoma de células renales (RCC). Se determinó la expresión de CD70 en la superficie de un panel de RCC mediante citometría de flujo. (A) Se muestran los perfiles de tinción de un anti-CD70 (curvas claras) y de una IgG de control (curvas oscuras) en cuatro líneas celulares de RCC representativas, 786-O, Caki-1, Caki-2, y Hs 835.T, y dos líneas epiteliales tubulares renales normales, RPTEC y HRCE. (B) Se compara la expresión de CD70 en líneas celulares de RCC adicionales (CAL54, SK-RC-6, SK-RC-7, 786-O, A498, y ACHN) con las líneas celulares mostradas en (A). Se representa la intensidad de fluorescencia media de la tinción anti-CD70 y la fluorescencia de fondo. Los números sobre cada barra indican la intensidad de fluorescencia media obtenida a partir de la unión anti-CD70 o la fluorescencia de fondo.

Figura 10: Actividades de inhibición del crecimiento y citotóxicas de 1F6-vcAFP. Se incubaron células 786-O o Caki-1 con dosis graduadas de 1F6-vcAFP o del IgG-vcAFP de control sin unión. Las células se incubaron durante un total de 96 horas. Se usó la incorporación de 3 H-timidina (panel superior) y la reducción de alamarBlue (panel inferior) para determinar la proliferación y la viabilidad celular, respectivamente. Los datos se expresan como porcentajes del control sin tratar. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los valores obtenidos a partir de los pocillos cuatruplicados.

Figura 11: Efecto de ADCs anti-CD70 sobre la proliferación de líneas celulares de RCC. Se determinaron las curvas de respuesta dosis sobre la actividad de inhibición del crecimiento o la citotoxicidad de ADCs de 1F6 tal como se describió en la Figura 10 para obtener los valores de CI_{50} . Se resumen las CI_{50} s de los ADCs 1F6-vcMMAE, 1F6-vcMMAF, 1F6-vcAFP, o dos IgGs de control sin unión (IgG) sobre la proliferación de las líneas de RCC CD70⁺ (Caki-1, Caki-2, 786-O, 769-P, SK-RC-6, SK-RC-7, ACHN, CAL54, y A498), una línea de RCC CD70⁻ (Hs 835.T), y líneas de células epiteliales tubulares de riñón normales (RPTEC y HRCE). También se resume el efecto de 1F6-vcMMAF y 1F6-vcAFP sobre la viabilidad de un subgrupo de las líneas celulares.

Figura 12: Eficacia *in vivo* de 1F6-vcAFP en un modelo de RCC. Los tumores se iniciaron en ratones atímicos implantando bloques de tejido tumoral (30 mm³ de tamaño) que contenían células Caki-1. El tratamiento comenzó cuando el tamaño medio del tumor en un grupo de tratamiento fue de alrededor de 100 mm³. En el panel superior, el tratamiento para los grupos de 1F6 e IgG comenzó 17 días tras la implantación (flecha oscura), mientras el tratamiento para los grupos 1F6-vcAFP e IgG-vcAFP comenzó 25 días tras la implantación (flecha clara). Se administraron las dosis indicadas de mAbs sin conjugar o de sus ADCs durante un curso de tratamiento con un calendario q4dx4. El panel inferior muestra los resultados de un experimento repetido cuando el tratamiento comenzó 14 días (flecha oscura) tras la implantación del tumor con 3 mg/kg y un calendario q4dx4 de 1F6-vcAFP o IgG-vcAFP.

Figura 13: Expresión de CD70 inducida mediante la activación en un clon de células T. Se activó un clon de células T C1A representativo mediante fitohemaglutinina A-L (PHA-L), células de soporte irradiadas, IL-2, e IL-4. Se determinó la expresión de CD25 (panel izquierdo) y CD70 (panel derecho) en los días 0, 2, 4, y 8 mediante análisis de citometría de flujo.

Figura 14: Efecto de los ADCs anti-CD70 sobre la proliferación de clones de células T activadas. Se indujeron clones de células T en reposo C2A, 40D8, y 4.01.1 para que expresasen CD70 tal como se describe. En el máximo de la expresión de CD70 (2 días tras la activación), las células se recogieron y se trataron con dosis graduadas de 1F6-vcMMAE, 1F6-vcAFP, o los ADCs de IgG de control sin unión (IgG) correspondientes tal como se indica en la figura en presencia de rhIL-2 y rhIL-4. Las células se expusieron a los ADCs continuamente durante 72 horas adicionales. Se determinó la proliferación de las células T mediante un pulso de 3 H-TdR durante las últimas 16 horas de incubación.

Figura 15: Efecto de los ADCs anti-CD70 sobre una reacción mixta de linfocitos. Se estableció una MLR entre PBMCs y células CESS alogénicas irradiadas. Se muestra la expresión de CD70 sobre las células T alo-reativas activadas en el panel superior. La unión del mAb anti-CD70 y de la IgG de control se indica mediante las curvas claras y oscuras, respectivamente. Se añadieron dosis graduadas de 1F6-vcMMAE o 1F6-vcAFP al cultivo en el inicio. Los cultivos se expusieron a los ADCs durante un total de 120 horas. Se determinó la proliferación de las células T mediante un pulso de ^3H -timidina durante las últimas 16 horas de incubación (panel inferior).

Figura 16: Efecto de anti-CD70 o de ADC anti-CD70 sobre la proliferación de células T inducida por antígenos. Las células T enriquecidas en cuanto a la reactividad hacia el toxoide tetánico se estimularon con células dendríticas autólogas y toxoide tetánico en presencia de dosis graduadas de 1F6, 1F6-vcMMAE, o 1F6-vcAFP durante un total de 96 horas. Se determinó la proliferación de las células T mediante un pulso de ^3H -timidina durante las últimas 16 horas de incubación.

Figuras 17A y B: Inducción de CD70 durante la expansión de células T específicas de antígeno. Se estimularon PBMCs de un donante HLA-A0201 normal con el péptido M1 derivado de la proteína de la matriz del virus de la gripe. (A) La expansión de células CD8^+ específicas del péptido M1 que expresaban la cadena $\text{V}\beta 17$ de TCR se siguió mediante citometría de flujo (paneles superiores). El panel inferior izquierdo muestra el porcentaje de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ que expresan CD70, y el panel inferior derecho muestra la intensidad de la expresión de CD70 sobre las células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ en expansión. (B) Un ejemplo representativo de la inducción específica de CD70 sobre las células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ en expansión tras la estimulación con el péptido M1 durante cinco días. Se muestra la unión de la IgG de control (curvas claras) y del mAb anti-CD70 (curvas oscuras) sobre las células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^-$ o $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$.

Figura 18: Eliminación específica de las células T $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ específicas de antígeno mediante ADCs anti-CD70. Se estimularon PBMCs de un donante HLA-A0201 normal con el péptido M1 durante 5 días. Se añadieron ADCs de 1F6 o de IgG de control sin unión (cIgG) a las células a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se llevaron a cabo recuentos de células viables totales 24, 48, y 76 horas tras la adición del fármaco. Se determinó el porcentaje de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ en cada condición de cultivo mediante citometría de flujo tal como se muestra en la Figura 17. Se calcula el número total de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ para cada condición de cultivo (panel superior). El número de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ y $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^-$ en los cultivos tratados con 1F6-ADC se expresa como el porcentaje de los cultivos de control sin tratar (panel inferior).

Figura 19: Comparación de la respuesta a dosis de ADCs anti-CD70 en la eliminación de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ específicas de antígeno. Se estimularon PBMCs de un donante HLA-A0201 normal con el péptido M1 durante 5 días. Se administraron ADCs de 1F6 o de IgG de control sin unión (cIgG) a las células a las concentraciones finales especificadas. Se determinaron los porcentajes de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ 4 días tras la adición del ADC mediante citometría de flujo como en la Figura 17.

Figura 20: Efectos limitados de los ADCs de 1F6 sobre la capacidad de proliferación de las células T circundantes CD70^- . Se estimularon PBMCs de un donante HLA-A0201 normal con el péptido M1 durante 5 días. Las células se dejaron expandir o se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 1F6-vcMMAF durante 4 días adicionales. Se determinaron los porcentajes de células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ mediante citometría de flujo (columna izquierda). Para determinar la capacidad de proliferación de las células T inespecíficas de antígeno circundantes CD70^- , se eliminaron las células T $\text{V}\beta 17^+$ de los cultivos mediante inmunoeeliminación (columna central). Las células $\text{V}\beta 17^-$ resultantes se estimularon después con dosis graduadas de mAb anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados durante un total de 96 horas, y se detectó la síntesis de ADN mediante un pulso de ^3H -TdR durante las últimas 18 horas de incubación.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan métodos y composiciones relacionadas con el uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs) y derivados de ADC que se unen a CD70. Un fármaco conjugado con el anticuerpo ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células que expresan CD70 para tratar trastornos inmunológicos o los cánceres que expresan CD70. En un aspecto, los métodos y las composiciones están relacionadas con anticuerpos y derivados de los mismos que compiten con el anticuerpo monoclonal 1F6 ó 2F2 por la unión a CD70 y que, cuando se conjugan con un agente citotóxico, ejercen un efecto citotóxico o citostático para eliminar o inhibir la proliferación de las células que expresan CD70. Los anticuerpos hacia CD70 que se pueden usar de acuerdo con los métodos y las composiciones descritas en la presente memoria incluyen anticuerpos monoclonales así como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos (p.ej., una forma humanizada o quimérica de 1F6 ó 2F2), y tales anticuerpos conjugados con agentes citotóxicos o inmunosupresores tales como, por ejemplo, fármacos quimioterápicos.

Por la claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones.

I. Definiciones y Abreviaturas

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica pertinente respecto de los métodos y composiciones descritas. Tal como se usan en la presente memoria, los siguientes términos y frases tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se especifique de otra manera.

El término "inhibir" o "inhibición de", tal como se usa en la presente memoria, significa reducir en una cantidad medible, o prevenir completamente.

El término "agente", tal como se usa en la presente memoria, significa un elemento, compuesto o entidad molecular, que incluye, p.ej., un compuesto farmacéutico, terapéutico o farmacológico. Los agentes pueden ser naturales o sintéticos, o una combinación de los mismos. Un "agente terapéutico" es un agente que ejerce un efecto terapéutico (p.ej., beneficioso) sobre las células cancerosas o sobre las células inmunológicas activadas, solo o en combinación con otro agente (p.ej., una enzima convertidora del profármaco en combinación con un profármaco). Típicamente, los agentes terapéuticos útiles de acuerdo con los métodos y composiciones descritas en la presente memoria son aquellos que ejercen un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor.

"Efecto citotóxico", en referencia al efecto de un agente sobre una célula, significa la destrucción de la célula. "Efecto citostático" significa la inhibición de la proliferación de la célula. Un "agente citotóxico" significa un agente que tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula, por lo que reduce o inhibe el crecimiento, respectivamente, de las células de una población celular.

El término "eliminar", en el contexto del efecto de un conjugado resto que se dirige a CD70-fármaco sobre las células que expresan CD70, se refiere a la reducción o eliminación de las células que expresan CD70.

El término "agente inmunosupresor" tal como se usa en la presente memoria significa un agente que inhibe el desarrollo o el mantenimiento de una respuesta inmunológica. Tal inhibición por un agente inmunosupresor puede ser efectuada, por ejemplo, por eliminación de células inmunológicas (v.g., linfocitos T o B); por inducción o generación de células inmunológicas que pueden modular (por ejemplo, regular a la baja) la capacidad funcional de otras células; inducción de un estado no interactivo en células inmunológicas (v.g., anergia); o por aumento, disminución o cambio de la actividad o la función de células inmunológicas, incluyendo, por ejemplo, alteración del modelo de proteínas expresadas por estas células (v.g., producción y/o secreción alterada de ciertas clases de moléculas tales como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, cinasas, moléculas coestimuladoras u otros receptores de la superficie celular, y similares). En realizaciones típicas, un agente inmunosupresor tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula inmunológica que promueve una respuesta inmunológica.

"Célula inmunológica" tal como se usa en la presente memoria significa cualquier célula de linaje hematopoyético implicada en la regulación de una respuesta inmunológica frente a un antígeno (v.g., un autoantígeno). En realizaciones típicas, una célula inmunológica es un linfocito T, un linfocito B, o una célula dendrítica.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y sus equivalentes, y no se refiere a una longitud específica de un producto; así, los "péptidos" y las "proteínas" están incluidas dentro de la definición de un polipéptido. También están incluidos dentro de la definición de los polipéptidos los "anticuerpos", tal como se definen en la presente memoria. Una "región polipeptídica" se refiere a un segmento de un polipéptido cuyo segmento puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o motivos (p.ej., una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más CDRs). El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido que tiene típicamente al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido. Un "derivado" incluye un polipéptido o fragmento del mismo que tiene sustituciones de aminoácidos conservativas respecto de un segundo polipéptido; un polipéptido o fragmento del mismo que se modifica mediante la unión covalente de una segunda molécula tal como, p.ej., mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (p.ej., aminoácidos artificiales y similares), los polipéptidos con enlaces sin sustituir, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como artificiales.

El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulinas, es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas, o fragmentos de los mismos, que contienen un sitio de unión al antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno específico (p.ej., CD70), o (b) derivados sustituidos de manera conservativa de tales polipéptidos de inmunoglobulinas o fragmentos que se unen de manera inmuno-específica al antígeno (p.ej., CD70). Los anticuerpos se describen en general, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

En el contexto de los polipéptidos de inmunoglobulinas o los fragmentos de los mismos tal como se definieron anteriormente, una "sustitución conservativa" significa una o más sustituciones de aminoácidos que no reducen sustancialmente la unión específica (p.ej., medida mediante la K_D) del polipéptido de inmunoglobulina o del fragmento del mismo a un antígeno (es decir, las sustituciones que incrementan la unión, que no alteran de manera significativa la unión, o que reducen la unión no más de alrededor de un 40%, típicamente no más de alrededor de un 30%, más típicamente no más de alrededor de un 20%, aún más típicamente no más de alrededor de un 10%, o muy típicamente no más de alrededor de un 5%, tal como se determina mediante ensayos de unión habituales tales como, p.ej., ELISA).

Un "derivado de anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, significa un anticuerpo, tal como se definió anteriormente, que se modifica mediante unión covalente de una molécula heteróloga tal como, p.ej., mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, acetilación o fosforilación que no está asociada normalmente al anticuerpo, y similares.

5 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que procede de un único clon de células, lo que incluye cualquier clon de células eucarióticas o procarióticas, o un clon de fagos, y no al método mediante el cual se produce. Así, la expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en la presente memoria, no se limita a los anticuerpos producidos por medio de la tecnología de hibridomas.

10 El término "heterólogo", en el contexto de un polipéptido, significa que procede de una fuente diferente (p.ej., una célula, tejido, organismo o especie) en comparación con otro polipéptido, de forma que los dos polipéptidos son diferentes. Típicamente, un polipéptido heterólogo es de una especie diferente.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "funcional", en el contexto de un anticuerpo anti-CD70 o de un derivado del mismo a usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, indica que el anticuerpo o su derivado (1) es capaz de unirse a CD70 y (2) reduce o inhibe la proliferación de las células que expresan CD70 cuando se conjuga con un agente citotóxico, o tiene un efecto inmunosupresor sobre una célula inmunológica cuando se conjuga con un agente inmunosupresor.

20 Las expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean con una correspondencia máxima. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (p.ej., se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Después se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/n° total de posiciones (p.ej., posiciones solapantes) x 100). En ciertas realizaciones, las dos secuencias tienen la misma longitud.

30 La expresión "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, o al menos un 65% de identidad; típicamente al menos un 70% o al menos un 75% de identidad; más típicamente al menos un 80% o al menos un 85% de identidad; e incluso más típicamente al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 98% de identidad (tal como se determina mediante el uso de uno de los métodos expuestos más adelante).

35 La "similitud" o el "porcentaje de similitud", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales o que están sustituidos de manera conservativa cuando se comparan y se alinean con una correspondencia máxima, tal como se mide mediante el uso de uno de los métodos expuestos más adelante. A modo de ejemplo, una primera secuencia de aminoácidos se puede considerar similar a una segunda secuencia de aminoácidos cuando la primera secuencia de aminoácidos es al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, o incluso un 95% idéntica, o está sustituida de manera conservativa, respecto de la segunda secuencia de aminoácidos cuando se comparan con un número igual de aminoácidos que el número contenido en la primera secuencia, o cuando se comparan con una alineación de polipéptidos que se ha alineado mediante un programa informático de similitudes conocido en la técnica (véase más adelante).

45 La expresión "similitud sustancial", en el contexto de las secuencias polipeptídicas, indica que una región polipeptídica tiene una secuencia con al menos un 70%, típicamente al menos un 80%, más típicamente al menos un 85%, e incluso más típicamente al menos un 90% o al menos un 95% de similitud de secuencias respecto de una secuencia de referencia. Por ejemplo, un polipéptido es sustancialmente similar respecto de un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren por una o más sustituciones conservativas.

50 En el contexto de los anticuerpos anti-CD70 o los derivados de los mismos, una proteína que tiene una o más regiones polipeptídicas sustancialmente idénticas o sustancialmente similares respecto de una o más regiones de unión al antígeno (p.ej., una región variable de la cadena pesada o ligera, o una CDR de la cadena pesada o ligera) de un anticuerpo anti-CD70 mantiene la unión específica a un epítipo de CD70 reconocido por el anticuerpo anti-CD70, tal como se determina mediante el uso de cualquiera de los diversos inmunoensayos habituales conocidos en la técnica, o tal como se menciona en la presente memoria.

55 La determinación del porcentaje de identidad o del porcentaje de similitud entre dos secuencias se puede llevar a cabo mediante el uso de un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Tal algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Se pueden llevar a cabo búsquedas de nucleótidos mediante BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas mediante BLAST se pueden llevar a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína de interés. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, se puede utilizar el Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda repetida que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p.ej., XBLAST y NBLAST) (véase, p.ej., la página de Internet www.ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo preferido no limitante de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Tal algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete informático de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla restos por pesos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización por hueco de 4. Se conocen en la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias, e incluyen ADVANCE y ADAM tal como se describe en Torellis y Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8. En FASTA, ktup es una opción de control que ajusta la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se hallan regiones similares en las dos secuencias que se comparan observando los pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup se puede ajustar a 2 ó 1 para secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto, si no se especifica ktup, es 2 para las proteínas y 6 para el ADN. Para una descripción adicional de los parámetros de FASTA, véase, p.ej., bioweb.pasteur.fr/docs/man/man/fasta.1.html#sect2, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia.

De manera alternativa, la alineación de secuencias proteicas se puede llevar a cabo mediante el uso del algoritmo CLUSTAL W, tal como describieron Higgins *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "prevención", "prevenir" se refieren a la administración de un conjugado anticuerpo anti-CD70-fármaco (ADC) o derivado de ADC a un sujeto antes del inicio de un síntoma clínico o diagnóstico de cáncer un que expresa CD70 o de un trastorno inmunológico (p.ej., la administración a un individuo con predisposición o con un riesgo elevado de adquirir el cáncer que expresa CD70 o el trastorno inmunológico) para (a) bloquear la aparición o el inicio del trastorno inmunológico o del cáncer que expresa CD70, uno o más síntomas clínicos o diagnósticos del mismo, (b) inhibir la gravedad del inicio del trastorno inmunológico o del cáncer que expresa CD70, o (c) disminuir la probabilidad del inicio del trastorno inmunológico o del cáncer que expresa CD70.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a frenar, detener o invertir la progresión de un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD70 en un sujeto, tal como se demuestra mediante una disminución o eliminación de un síntoma clínico o diagnóstico de la enfermedad, mediante la administración de un ADC anti-CD70 o derivado de ADC al sujeto tras el inicio del síntoma clínico o diagnóstico del trastorno inmunológico o el cáncer que expresa CD70 en cualquier fase clínica. El tratamiento puede incluir, por ejemplo, la disminución de la gravedad de un síntoma, el número de síntomas, o la frecuencia de la recidiva.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente memoria, significa que ha sido aprobado por parte de una agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal, o que se ha listado de la farmacopea de los EE.UU., o en otra farmacopea reconocida en general para el uso en animales, y más en particular en seres humanos. La expresión "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra un conjugado resto que se dirige a CD70-fármaco.

La expresión "cantidad eficaz", en el contexto de la administración de un ADC anti-CD70 o de un derivado de ADC, se refiere a la cantidad del ADC o del derivado de ADC que es suficiente para inhibir la aparición o mejorar uno o más síntomas clínicos o diagnósticos de un trastorno inmunológico o de un cáncer que expresa CD70 en un sujeto. Se administra una cantidad eficaz de un agente según los métodos descritos en la presente memoria en un "régimen eficaz". La expresión "régimen eficaz" se refiere a una combinación de una cantidad del agente y una frecuencia de dosificación adecuada para llevar a cabo el tratamiento o la prevención de un trastorno inmunológico o de un cáncer que expresa CD70.

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina-p-fenilendiamina (véase la Fórmula XVI más adelante).

La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E (véase la Fórmula XI más adelante).

La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido para-acetil benzoico (véase la Fórmula XX más adelante).

La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido benzoilvalérico (véase la Fórmula XXI más adelante).

La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaprina-fenilalanina (véase la Fórmula XIX más adelante).

5 Las abreviaturas "fk" y "phe-lys" se refieren al enlazador fenilalanina-lisina.

Las abreviaturas "vc" y "val-cit" se refieren al enlazador valina-citrulina.

II. Anticuerpos Anti-CD70 y Derivados de los Mismos

10 Los métodos y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan el uso de anticuerpos, o de derivados de los mismos, como ADCs que (a) se unen específicamente a CD70 y (b) cuando se conjugan con un agente terapéutico, el agente terapéutico ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células inmunológicas activadas o las células cancerosas que expresan CD70. Tal como se usa en la presente memoria, el término "derivado", en el contexto de un anticuerpo anti-CD70, se refiere a una molécula que (i) tiene una región de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD70, o una región derivada del mismo (p.ej., mediante sustitución conservativa), y al menos una región polipeptídica u otro resto heterólogo respecto del anticuerpo anti-CD70, y (ii) se une específicamente a CD70 por medio de la región de unión al antígeno o de la región derivada de la misma. En las realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD70 es un mAb 1F6 ó 2F2 o un derivado de los mismos. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo compite con el anticuerpo monoclonal 1F6 ó 2F2 por la unión a CD70.

20 En las realizaciones típicas, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo, cuando se conjuga con un agente citotóxico, ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre las células cancerosas que expresan CD70, o, cuando se conjuga con un agente citotóxico o inmunosupresor ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre células dendríticas o linfocitos activados, para el tratamiento de un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD70, respectivamente.

25 Los anticuerpos anti-CD70 adecuados para el uso de acuerdo con las presentes composiciones y métodos son típicamente monoclonales, y pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos quiméricos (p.ej., que tienen una región constante humana y una región variable de ratón), humanizados, o humanos; anticuerpos de cadena simple; o similares. Las moléculas de inmunoglobulinas pueden ser de cualquier tipo (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno tal como, por ejemplo, un Fab, un F(ab'), un F(ab')₂, una cadena Fd, un Fv de cadena simple (scFv), un anticuerpo de cadena simple, un Fv unido por puentes disulfuro (sdFv), un fragmento que comprende un dominio V_L o V_H, o fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, o fragmentos de unión a CD70 de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, que incluyen los anticuerpos de cadena simple, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de lo siguiente: la región de la bisagra, los dominios CH1, CH2, CH3 y CL. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región de la bisagra, dominios CH1, CH2, CH3 y CL. Típicamente, los anticuerpos son humanos, de roedores (p.ej., de ratón y de rata), de burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de indias, camélido, caballo, o pollo. Tal como se usa en la presente memoria, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas, de células B humanas, o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, tal como se describe más adelante y, por ejemplo, en las pat. de EE.UU. n° 5.939.598 y 6.111.166.

45 Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de multiespecificidad mayor. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de CD70, o pueden ser específicos tanto para CD70 como para una proteína heteróloga (véanse, p.ej., las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; y WO 92/05793; Tutt *et al.*, 1991, *J Immunol* 147:60-69; las pat. de EE.UU. n°s 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819; Kostelny *et al.*, 1992, *J Immunol* 148:1547-1553). Los anticuerpos multiespecíficos, que incluyen los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos, útiles para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria, son anticuerpos que se unen de manera inmuno-específica tanto a CD70 (que incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos que tienen las CDRs y/o las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales 2F2 y 1F6) y un segundo receptor o complejo receptor de la superficie celular, tal como un miembro de la superfamilia de genes de las inmunoglobulinas, un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína del sistema principal de histocompatibilidad, una lectina (de tipo C, tipo S, o tipo I), o una proteína de control del complemento. En una realización típica, la unión de la porción del anticuerpo multiespecífico a la segunda molécula o complejo receptor de la superficie celular aumenta el efecto citotóxico o citostático de un conjugado anticuerpo anti-CD70-fármaco.

55 En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD70 es agonista, no agonista o antagonista con respecto a CD70. En otra realización específica, el anticuerpo anti-CD70 no bloquea la unión del ligando de CD70 a CD70. Aún

en otra realización, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo es un anticuerpo bloqueante (es decir, un anticuerpo que bloquea la unión de CD27 a CD70).

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD70 comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR(s) del anticuerpo monoclonal 1F6 (véase la Tabla 1). Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir una CDR de la cadena pesada y/o una CDR de la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada correspondiente (regiones H1, H2, o H3) o a una CDR de la cadena ligera correspondiente (regiones L1, L2, o L3) del mAb 1F6 (SEQ ID N°:6; SEQ ID N°:8; SEQ ID N°:10; SEQ ID N°:16; SEQ ID N°:18; o SEQ ID N°:20, respectivamente). En las realizaciones típicas, el anticuerpo anti-CD70 tiene dos o tres CDRs de la cadena pesada y/o dos o tres CDRs de la cadena ligera que son sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDRs de la cadena pesada y/o ligera correspondientes del mAb 1F6. En las realizaciones específicas, una CDR sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada o ligera de 1F6 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:6, SEQ ID N°:8, SEQ ID N°:10, SEQ ID N°:16, SEQ ID N°:18, o SEQ ID N°:20.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, en las que un anticuerpo anti-CD70 tiene al menos una CDR de la cadena pesada sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada del mAb 1F6, el anticuerpo o el derivado del mismo incluye además al menos una CDR de la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena ligera del mAb 1F6.

En ciertas realizaciones típicas, un anticuerpo anti-CD70 incluye un dominio variable de la cadena pesada o ligera, y el dominio variable tiene (a) un grupo de tres CDRs sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDRs correspondientes del mAb 1F6, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede incluir un dominio variable de la cadena pesada o ligera, y el dominio variable tiene (a) un grupo de tres CDRs, en el que el grupo de CDRs son del anticuerpo monoclonal 1F6, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales, en el que el grupo de regiones estructurales son idénticas o diferentes del grupo de regiones estructurales del mAb 1F6.

En una realización específica, el anticuerpo anti-CD70 incluye una región variable de la cadena pesada que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a la región variable de la cadena pesada del mAb 1F6 (es decir, sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°:2, véase la Tabla 1) y/o una región variable de la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a las regiones variables de la cadena ligera del mAb 1F6 (es decir, sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°:12, véase la Tabla 1). Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:2 y, opcionalmente, puede incluir una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:12. En una realización ejemplar, el anticuerpo anti-CD70 es el mAb 1F6.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD70 comprende una o más CDRs sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR(s) del anticuerpo monoclonal 2F2 (véase la Tabla 1). Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir una CDR de la cadena pesada y/o una CDR de la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada correspondiente (regiones H1, H2, o H3) o a una CDR de la cadena ligera correspondiente (regiones L1, L2, o L3) del mAb 2F2 (SEQ ID N°:26, SEQ ID N°:28; SEQ ID N°:30; SEQ ID N°:36, SEQ ID N°:38 o SEQ ID N°:40). En las realizaciones típicas, el anticuerpo anti-CD70 tiene dos o tres CDRs de la cadena pesada y/o dos o tres CDRs de la cadena ligera que son sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDRs de la cadena pesada y/o ligera correspondientes del mAb 2F2. En las realizaciones específicas, una CDR sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada o de la cadena ligera de 2F2 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:26, SEQ ID N°:28, SEQ ID N°:30; SEQ ID N°:36, SEQ ID N°:38, o SEQ ID N°:40.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, en las que un anticuerpo anti-CD70 tiene al menos una CDR de la cadena pesada sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada del mAb 2F2, el anticuerpo o el derivado del mismo incluye además al menos una CDR de la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena ligera del mAb 2F2.

En ciertas realizaciones típicas, un anticuerpo anti-CD70 incluye un dominio variable de la cadena pesada o ligera, y el dominio variable tiene (a) un grupo de tres CDRs sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDRs correspondientes del mAb 2F2, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede incluir un dominio variable de la cadena pesada o ligera, y el dominio variable tiene (a) un grupo de tres CDRs, en el que el grupo de CDRs son del anticuerpo monoclonal 2F2, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales, en el que el grupo de regiones estructurales es idéntico o diferente al grupo de regiones estructurales del mAb 2F2.

En una realización específica, el anticuerpo anti-CD70 incluye una región variable de la cadena pesada que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a la región variable de la cadena pesada del mAb 2F2 (es decir,

5 sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°:22, véase la Tabla 1) y/o una región variable de la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a las regiones variables de la cadena ligera del mAb 2F2 (es decir, sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°:32, véase la Tabla 1). Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:22 y, opcionalmente, puede incluir además una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°:32. En una realización ejemplar, el anticuerpo anti-CD70 es el mAb 2F2.

A continuación se proporciona una tabla que indica la región de 1F6 ó 2F2 a la que corresponde cada SEQ ID N°:

Tabla 1

MOLÉCULA	NUCLEÓTIDO O AMINOÁCIDO	SEQ ID N°
Región Variable de la Cadena Pesada de 1F6	Nucleótido	1
Región Variable de la Cadena Pesada de 1F6	Aminoácido	2
Péptido Señal de la Cadena Pesada de 1F6	Nucleótido	3
Péptido Señal de la Cadena Pesada de 1F6	Aminoácido	4
Cadena Pesada-CDR1(H1) de 1F6	Nucleótido	5
Cadena Pesada-CDR1(H1) de 1F6	Aminoácido	6
Cadena Pesada-CDR2(H2) de 1F6	Nucleótido	7
Cadena Pesada-CDR2(H2) de 1F6	Aminoácido	8
Cadena Pesada-CDR3(H3) de 1F6	Nucleótido	9
Cadena Pesada-CDR3(H3) de 1F6	Aminoácido	10
Región Variable de la Cadena Ligera de 1F6	Nucleótido	11
Región Variable de la Cadena Ligera de 1F6	Aminoácido	12
Péptido Señal de la Cadena Ligera de 1F6	Nucleótido	13
Péptido Señal de la Cadena Ligera de 1F6	Aminoácido	14
Cadena Ligera-CDR1(L1) de 1F6	Nucleótido	15
Cadena Ligera-CDR1(L1) de 1F6	Aminoácido	16
Cadena Ligera-CDR2(L2) de 1F6	Nucleótido	17
Cadena Ligera-CDR2(L2) de 1F6	Aminoácido	18
Cadena Ligera-CDR3(L3) de 1F6	Nucleótido	19
Cadena Ligera-CDR3(L3) de 1F6	Aminoácido	20
Región Variable de la Cadena Pesada de 2F2	Nucleótido	21
Región Variable de la Cadena Pesada de 2F2	Aminoácido	22
Péptido Señal de la Cadena Pesada de 2F2	Nucleótido	23
Péptido Señal de la Cadena Pesada de 2F2	Aminoácido	24
Cadena Pesada-CDR1(H1) de 2F2	Nucleótido	25
Cadena Pesada-CDR1(H1) de 2F2	Aminoácido	26
Cadena Pesada-CDR2(H2) de 2F2	Nucleótido	27
Cadena Pesada-CDR2(H2) de 2F2	Aminoácido	28
Cadena Pesada-CDR3(H3) de 2F2	Nucleótido	29
Cadena Pesada-CDR3(H3) de 2F2	Aminoácido	30
Región Variable de la Cadena Ligera de 2F2	Nucleótido	31
Región Variable de la Cadena Ligera de 2F2	Aminoácido	32
Péptido Señal de la Cadena Ligera de 2F2	Nucleótido	33
Péptido Señal de la Cadena Ligera de 2F2	Aminoácido	34
Cadena Ligera-CDR1(L1) de 2F2	Nucleótido	35
Cadena Ligera-CDR1(L1) de 2F2	Aminoácido	36

Tabla 1

MOLÉCULA	NUCLEÓTIDO O AMINOÁCIDO	SEQ ID N°
Cadena Ligera-CDR2(L2) de 2F2	Nucleótido	37
Cadena Ligera-CDR2(L2) de 2F2	Aminoácido	38
Cadena Ligera-CDR3(L3) de 2F2	Nucleótido	39
Cadena Ligera-CDR3(L3) de 2F2	Aminoácido	40

Los anticuerpos anti-CD70 útiles en los métodos expuestos en la presente memoria se pueden describir o especificar también en cuanto a su afinidad de unión a CD70. Las afinidades de unión típicas incluyen las que tienen una constante de disociación o Kd menor de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

Los anticuerpos que se pueden usar en el tratamiento de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD70 se pueden generar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante el uso de una amplia diversidad de técnicas que incluyen, p.ej., el uso de la tecnología de hibridomas, técnicas recombinantes, y expresión en fagos, o una combinación de los mismos. Las técnicas de hibridomas se discuten en general, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., 1988); y Hammerling, *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, págs. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Los ejemplos de los métodos de expresión en fagos que se pueden usar para producir los anticuerpos anti-CD70 incluyen, p.ej., los descritos en Brinkman *et al.*, 1995, *J Immunol Methods* 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, *J Immunol Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, *Eur J Immunol* 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, *Gene* 187:9-18; Burton *et al.*, 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280; publicación PCT WO 92/01047; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las pat. de EE.UU. n°s 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Las técnicas para generar fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos se conocen también en general en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir los fragmentos Fab y F(ab')₂ mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulinas, mediante el uso de enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH 1 de la cadena pesada. También se pueden emplear técnicas para producir de manera recombinante los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ mediante el uso, p.ej., de los métodos descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, *BioTechniques* 12(6):864-869; y Sawai *et al.*, 1995, *AJRI* 34:26-34; y Better *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043.

Los ejemplos de las técnicas que se pueden usar para producir anticuerpos y Fvs de cadena simple incluyen las descritas en las pat. de EE.UU. n°s 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu *et al.*, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7995-7999; y Skerra *et al.*, 1988, *Science* 240:1038-1040.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo proceden de diferentes especies animales, tal como, por ejemplo, los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica (véase, p.ej., Morrison, *Science*, 1985, 229:1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; las pat. de EE.UU. n°s 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397).

Un anticuerpo anti-CD70 también puede ser un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos que se unen al antígeno deseado, y que tienen una o más CDRs de una especie que no es humana, y regiones estructurales y constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo los residuos estructurales de las regiones estructurales humanas se sustituirán con los residuos correspondientes del anticuerpo donante de las CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p.ej., mediante la modelización de las interacciones de los residuos de las CDR y los residuos estructurales para identificar los residuos estructurales importantes para la unión al antígeno, y mediante la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares (véase, p.ej., Queen *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.585.089; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323). Los anticuerpos se pueden humanizar mediante el uso de una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, el injerto de CDR (documento EP 0 239 400; publicación PCT WO 91/09967; pat. de EE.UU. n°s 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), el revestimiento o la modificación de la superficie (documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, *Molecular Immunology*, 1991, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska *et al.*, 1994, *PNAS* 91:969-973), y la reordenación aleatoria de cadenas (pat. de EE.UU. N° 5.565.332).

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, p.ej., los métodos de expresión en fagos (véase anteriormente) mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse además, p.ej., las pat. de EE.UU. n°s 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. Además, se puede generar un anticuerpo humano que reconoce un epítipo seleccionado mediante el uso de una técnica denominada "selección guiada", en la que se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p.ej., un anticuerpo de ratón, para dirigir la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (véase, p.ej., Jaspers *et al.*, 1994, *Bio/technology* 12:899-903). También se pueden producir anticuerpos humanos mediante el uso de ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos monoclonales de acción selectiva contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados mediante el uso de la tecnología de hibridomas convencional. Para un resumen de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93. Para una discusión detallada de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y de anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para la producción de tales anticuerpos, véanse, p.ej., las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n° 0 598, 877; las pat. de EE.UU. n°s 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, se pueden contratar empresas tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos de acción selectiva contra un antígeno seleccionado mediante el uso de una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Tal como se expuso anteriormente, también se puede usar un derivado de un anticuerpo anti-CD70 en la práctica de los métodos presentes. En general, un derivado de un anticuerpo anti-CD70 comprende un anticuerpo anti-CD70 (que incluye, p.ej., un fragmento de unión al antígeno o polipéptidos sustituidos de manera conservativa) y al menos una región polipeptídica u otro resto heterólogo respecto del anticuerpo anti-CD70. Por ejemplo, se puede modificar un anticuerpo anti-CD70, p.ej., mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, de forma que la unión covalente no impida que el derivado del anticuerpo se una de manera específica a CD70 por medio de la región de unión al antígeno o de la región derivada de la misma, o que el fármaco conjugado ejerza (a) un efecto citotóxico o citostático sobre las células cancerosas que expresan CD70, o (b) un efecto citostático, citotóxico o inmunosupresor sobre linfocitos activados. Las modificaciones típicas incluyen, p.ej., la glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante cualquier grupo protector/bloqueante conocido, la escisión proteolítica, la unión a un ligando celular u otra proteína, y similares. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitación, la escisión química específica, la acetilación, la formilación, la síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En ciertas realizaciones, el derivado de anticuerpo es un multímero, tal como, por ejemplo, un dímero, que comprende uno o más monómeros, en el que cada monómero incluye (i) una región de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD70, o una región polipeptídica derivada de la misma (tal como, p.ej., mediante sustitución conservativa de uno o más aminoácidos), y (ii) una región polipeptídica multimerizante (p.ej., dimerizante), de forma que el derivado de anticuerpo forma multímeros (p.ej., homodímeros) que se unen de manera específica a CD70. En las realizaciones típicas, una región de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD70, o una región polipeptídica derivada de la misma, se fusiona de manera recombinante o química con una proteína heteróloga, en la que la proteína heteróloga comprende un dominio de dimerización o multimerización. Antes de la administración del derivado de anticuerpo a un sujeto con el fin de tratar o prevenir trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD70, el derivado se somete a condiciones que permiten la formación de un homodímero o heterodímero. Un heterodímero, tal como se usa en la presente memoria, puede comprender dominios de dimerización idénticos pero regiones de unión al antígeno de CD70 diferentes, regiones de unión al antígeno de CD70 idénticas pero dominios de dimerización diferentes, o regiones de unión al antígeno de CD70 y dominios de dimerización diferentes.

Los dominios de dimerización típicos son aquellos que se originan a partir de factores de transcripción. En una realización, el dominio de dimerización es el de una región básica de una cremallera de leucinas ("bZIP") (véase C. Vinson *et al.*, 1989, *Science* 246:911-916). Los dominios de cremalleras de leucinas útiles incluyen, por ejemplo, los del factor de transcripción de levaduras GCN4, el factor de transcripción de mamíferos CCAAT/proteína de unión al potenciador C/EBP, y las proteínas de transformación nuclear en productos de oncogenes, Fos y Jun (véase Landschultz *et al.*, 1988, *Science* 240:1759-1764; Baxevanis y Vinson, 1993, *Curr. Op. Gen. Devel.* 3:278-285; O'Shea *et al.*, 1989, *Science* 243:538-542). En otra realización, el dominio de dimerización es el de una proteína con una región básica hélice-bucle-hélice ("bHLH") (véase Murre *et al.*, 1989, *Cell* 56:777-783. Véase además Davis *et al.*, 1990, *Cell* 60:733-746; Voronova y Baltimore, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4722-4726). Las proteínas hHLH especialmente útiles son myc, max, y mac.

Aún en otras realizaciones, el dominio de dimerización es una región constante de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada o un dominio de la misma (p.ej., un dominio CH1, un dominio CH2, o un dominio CH3) (véanse, p.ej., las pat. de EE.UU. n°s 5.155.027; 5.336.603; 5.359.046; y 5.349.053; los documentos EP 0 367 166; WO 96/04388).

Se sabe que se forman heterodímeros entre Fos y Jun (Bohmann *et al.*, 1987, *Science* 238:1386-1392), entre miembros de la familia ATF/CREB (Hai *et al.*, 1989, *Genes Dev.* 3:2083-2090), entre miembros de la familia C/EBP (Cao *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:1538-1552; Williams *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:1553-1567; Roman *et al.*, 1990, *Genes Dev.* 4:1404-1415), y entre miembros de las familias ATF/CREB y Fos/Jun, Hai y Curran, 1991, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3720-3724). Por lo tanto, cuando un conjugado proteína de unión a CD70-fármaco se administra a un sujeto en forma de un heterodímero que comprende diferentes dominios de dimerización, se puede usar cualquier combinación de los anteriores.

En otras realizaciones, un derivado de anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo anti-CD70 conjugado con un segundo anticuerpo (un "heteroconjugado de anticuerpos") (véase la pat. de EE.UU. n° 4.676.980). Los heteroconjugados útiles para poner en práctica los presentes métodos comprenden un anticuerpo que se une a CD70 (p.ej., un anticuerpo que tiene las CDRs y/o las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales 2F2 ó 1F6) y un anticuerpo que se une a un receptor o complejo receptor de la superficie, tal como un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína principal de histocompatibilidad, una lectina (de tipo C, tipo S, o tipo I), o una proteína de control del complemento.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo inhibe de manera competitiva la unión del mAb 1F6 ó 2F2 a CD70, tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para la determinación de la unión competitiva (tal como, p.ej., los inmunoensayos descritos en la presente memoria). En las realizaciones típicas, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de 1F6 ó 2F2 a CD70 en al menos un 50%, más típicamente al menos un 60%, aún más típicamente al menos un 70%, y lo más típicamente al menos un 75%. En otras realizaciones, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de 1F6 ó 2F2 a CD70 en al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, o al menos un 95%.

Se puede ensayar la unión específica de los anticuerpos a CD70 mediante cualquiera de diversos métodos conocidos. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, por ejemplo, los sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como las transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar unos cuantos. Tales ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, p.ej., Ausubel *et al.*, eds., *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 4ª ed. 1999); Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999).

Además, se puede determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a CD70 y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-CD70 mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de CD70 marcado (p.ej., ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de CD70 sin marcar, y la detección del anticuerpo unido al CD70 marcado. Se puede determinar la afinidad del anticuerpo por CD70 y la velocidad de disociación de la unión a partir de los datos mediante un análisis de la representación de Scatchard. También se puede determinar la competición con un segundo anticuerpo (tal como, p.ej., el mAb 1F6 ó 2F2) mediante el uso de radioinmunoensayos. En este caso, se incubaba CD70 con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (p.ej., ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo sin marcar. De manera alternativa, se puede determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a CD70 y las velocidades de asociación y disociación de una interacción anticuerpo-CD70 mediante la resonancia de plasmón superficial.

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, los anticuerpos anti-CD70 o los derivados de los mismos, cuando se conjugan con un agente terapéutico, se pueden interiorizar y acumular en una célula que expresa CD70, en la que el agente terapéutico ejerce un efecto (p.ej., un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor). En las realizaciones adicionales, los anticuerpos anti-CD70 o los derivados de los mismos, cuando se conjugan con un agente terapéutico, se pueden dirigir y acumular en la membrana de una célula que expresa CD70, en la que el agente terapéutico ejerce un efecto (p.ej., un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor). Aún en otras realizaciones, los anticuerpos anti-CD70 o los derivados de los mismos, cuando se conjugan con un agente terapéutico, se pueden dirigir a moléculas biológicas en una célula (p.ej., un agente antiinflamatorio) y acumularse en o cerca de las células que secretan o que se unen a la molécula biológica, en las que el agente terapéutico ejerce un efecto (p.ej., un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor).

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo anti-CD70 dado o un derivado, cuando se conjuga con un agente terapéutico, ejerce un efecto terapéutico correspondiente tras la unión a una célula que expresa CD70, p.ej., (1) incubando células que expresan CD70 independientemente con el anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo, (2) incubando las células con un reactivo secundario que está conjugado con el agente terapéutico y que se une específicamente al anticuerpo o al derivado del mismo, y (3) ensayando en las células la existencia del efecto terapéutico correspondiente. Se pueden analizar fácilmente múltiples anticuerpos o derivados de anticuerpos por medio de tales ensayos mediante el uso de un reactivo secundario que se une de manera específica a la región polipeptídica compartida por cada anticuerpo o derivado del mismo (p.ej., un anticuerpo anti-Ig). Por ejemplo, se

puede identificar un mAb anti-CD70 que se une a CD70 y que ejerce un efecto citotóxico cuando está conjugado con un agente citotóxico (p.ej., una auristatina tal como, por ejemplo, AFP, MMAF, o MMAE) mediante un ensayo de inmunotoxicidad indirecto, por ejemplo, tal como se describe en Chun *et al.*, 2003, *Supplement to Clinical Cancer Research*, Vol. 9. Brevemente, el agente citotóxico se conjuga con un anticuerpo secundario (p.ej., para mAbs murinos, un anti-IgG de ratón policlonal); las células que expresan CD70 se incuban con el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario conjugado con el agente citotóxico (p.ej., en placas de 96 pocillos, mediante el uso de sobrenadantes de hibridomas para el anticuerpo primario); y se determina la citotoxicidad dependiente del anticuerpo primario en un ensayo de citotoxicidad estándar (p.ej., un ensayo de viabilidad de células mediante MTT) (véase id.).

Los anticuerpos anti-CD70 y los derivados de los mismos que son útiles en los presentes métodos se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de proteínas, típicamente, p.ej., mediante técnicas de expresión recombinante. La expresión recombinante de un anticuerpo o de un derivado del mismo que se une a CD70 y que elimina o inhibe la proliferación de las células que expresan CD70 requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el derivado del mismo. Una vez que se ha obtenido un ácido nucleico que codifica tal proteína, se puede producir el vector para la producción de la molécula proteica mediante la tecnología del ADN recombinante con el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Se pueden usar técnicas habituales tales como, por ejemplo, las descritas en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3ª ed., 2001); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2ª ed., 1989); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons, Nueva York, 4ª ed., 1999); y Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 2ª ed., 1998) para los métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, cultivo celular, incorporación de transgenes, y expresión de proteínas recombinantes.

Por ejemplo, para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-CD70, un vector de expresión puede codificar una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, unido de manera operable a un promotor. Un vector de expresión puede incluir, por ejemplo, la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, p.ej., la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de EE.UU. nº 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en un vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa. El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo anti-CD70. En las realizaciones típicas para la expresión de los anticuerpos de cadena doble, se pueden co-expresar vectores que codifican las cadenas pesadas y ligeras en la célula hospedadora para la expresión de la molécula completa de inmunoglobulina.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vectores de expresión en hospedadores procariotas y eucariotas para expresar un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo. Típicamente, se usan células eucariotas, en particular para las moléculas de anticuerpo anti-CD70 recombinantes completas, para la expresión de la proteína recombinante. Por ejemplo, las células mamíferas tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor de los genes tempranos intermedios principales de un citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para la producción de anticuerpos anti-CD70 y derivados de los mismos (véase, p.ej., Foecking *et al.*, 1986, *Gene* 45:101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8:2).

Otros sistemas de expresión en hospedadores incluyen, por ejemplo, los sistemas de expresión basados en plásmidos en células bacterianas (véase, p.ej., Ruther *et al.*, 1983, *EMBO* 1,2:1791; Inouye e Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); sistemas de insectos tales como, p.ej., el uso del vector de expresión del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) en células de *Spodoptera frugiperda*; y los sistemas de expresión basados en virus en células mamíferas, tales como, p.ej., los sistemas basados en adenovirus (véase, p.ej., Logan y Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359; Bittner *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544).

Además, se puede elegir una cepa de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Las líneas celulares o los sistemas hospedadores apropiados se pueden elegir para asegurar la modificación y el procesamiento correcto (p.ej., la glicosilación, fosforilación, y escisión) de la proteína exógena expresada. Para este fin, se pueden usar células hospedadoras eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario y del producto génico. Tales células hospedadoras mamíferas incluyen, por ejemplo, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, y W138.

Se usa típicamente un sistema de expresión estable para la producción a largo plazo y con un alto rendimiento del anticuerpo anti-CD70 recombinante o del derivado del mismo. Por ejemplo, se pueden modificar las líneas celulares que expresan de manera estable el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo mediante la transformación de las células hospedadoras con ADN controlado por los elementos de control de la expresión apropiados (p.ej., secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación) y un marcador seleccionable, seguido por el cultivo de las células transformadas en un medio selectivo. El marcador seleccionable confiere resistencia a la selección, y permite que las células integren de manera estable el ADN en sus cromosomas

y crezcan para formar focos que a su vez se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Se pueden usar varios sistemas de selección, que incluyen, por ejemplo, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, y adenina fosforribosiltransferasa, que se pueden emplear en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además, se puede usar la resistencia a antimetabolitos como base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina. Se pueden aplicar de manera rutinaria los métodos conocidos habitualmente en la técnica de la tecnología del ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, N.Y., 1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual* (Stockton Press, N.Y., 1990); *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli *et al.* eds., John Wiley & Sons, N.Y., 1994, capítulos 12 y 13); y Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.

Los niveles de expresión de un anticuerpo o de un derivado se pueden incrementar mediante la amplificación con vectores (véase en general, p.ej., Bebbington y Hentschel, *The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning, Vol. 3* (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador del sistema de vector que expresa un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo es amplificable, un incremento del nivel del inhibidor presente en el medio de cultivo de células hospedadoras seleccionará las células hospedadoras que tengan un número de copias incrementado de un gen marcador que confiere resistencia al inhibidor. El número de copias del gen del anticuerpo asociado también se incrementará, por lo que se incrementará la expresión del anticuerpo o del derivado del mismo (véase Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

Cuando el anticuerpo anti-CD70 comprende una cadena pesada y una ligera o derivados de las mismas, la célula hospedadora se puede co-transfectar con dos vectores de expresión, de manera que el primer vector codifica la proteína de la cadena pesada y el segundo vector codifica la proteína de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igualada de las proteínas de las cadenas pesada y ligera. De manera alternativa, se puede usar un vector único que codifica, y es capaz de expresar, ambas proteínas de las cadenas pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se coloca generalmente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (véase Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender cADN o ADN genómico.

Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo (p.ej., mediante un animal, síntesis química o expresión recombinante), se puede purificar mediante cualquier método adecuado de purificación de proteínas, que incluye, por ejemplo, mediante cromatografía (p.ej., cromatografía de intercambio iónico o de afinidad (tal como, por ejemplo, cromatografía con Proteína A para la purificación de anticuerpos que tienen una región Fc intacta)), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica habitual para la purificación de proteínas. Un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo, por ejemplo, se puede fusionar con una secuencia marcadora, tal como un péptido, para facilitar la purificación mediante cromatografía de afinidad. Las secuencias de aminoácidos marcadoras adecuadas incluyen, p.ej., un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), y el marcador "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, 1984, *Cell* 37:767), y el marcador "flag".

Una vez que se produce un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo, se determina su capacidad para ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre las células cancerosas que expresan CD70 (cuando se conjuga con un agente citotóxico) o un efecto inmunosupresor sobre una célula inmunológica que expresa CD70 (cuando se conjuga a un agente inmunosupresor) mediante los métodos descritos más adelante o tal como se conoce en la técnica.

III. Conjugados Anticuerpo Anti-CD70-Fármaco

Las composiciones útiles en el tratamiento de un cáncer que expresa CD70 o de un trastorno inmunológico comprenden conjugados anticuerpo anti-CD70-fármaco (ADCs) o derivados de ADC anti-CD70. Un "ADC anti-CD70", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo anti-CD70 (tal como se describió en la Sección II, anteriormente) conjugado con un agente terapéutico. Un "derivado anti-CD70", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un derivado de un anticuerpo anti-CD70 (tal como se describió en la Sección II, anteriormente) conjugado con un agente terapéutico. En ciertas realizaciones, el ADC comprende un anticuerpo anti-CD70 (p.ej., un mAb 1F6 ó 2F2 o un fragmento o derivado del mismo, que incluye, por ejemplo, una forma quimérica o humanizada del mismo). Los ADCs o los derivados de ADC tal como se describen en la presente memoria producen efectos clínicamente beneficiosos sobre las células que expresan CD70 cuando se administran a un sujeto con un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD70, típicamente cuando se administran solos, pero también en combinación con otros agentes terapéuticos.

En las realizaciones típicas, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo se conjuga con un agente inmunosupresor o citotóxico, de forma que el ADC resultante o el derivado de ADC ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula cancerosa que expresa CD70, o un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre

una célula inmunológica (v.g., un linfocito o una célula dendrítica activados) cuando es captado o interiorizado por la célula. Los restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos o derivados de anticuerpos son agentes quimioterápicos, enzimas conversoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos, o toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo se puede conjugar con un agente citotóxico tal como un agente quimioterápico (véase más adelante), o una toxina (p.ej., un agente citostático o citocida tal como, p.ej., abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria). Los ejemplos de agentes adicionales que son útiles para la conjugación con las moléculas anti-CD70 se proporcionan más adelante.

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo se conjuga con una enzima conversora de profármacos. La enzima conversora de profármacos se puede fusionar de manera recombinante con el anticuerpo o el derivado del mismo, o se puede conjugar químicamente con él mediante el uso de métodos conocidos. Las enzimas conversoras de profármacos ejemplares son la carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Se conocen bien las técnicas para la conjugación de agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos (véase, p.ej., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld *et al.* eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (Robinson *et al.* eds., Marcel Dekker, Inc., 2^a ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera *et al.* eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin *et al.* eds., Academic Press, 1985); y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase además, p.ej., la publicación PCT WO 89/12624).

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, el ADC o el derivado de ADC anti-CD70 se interioriza y se acumula dentro de una célula que expresa CD70, en la que el ADC o el derivado de ADC ejerce un efecto terapéutico (p.ej., un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor).

Típicamente, cuando se usa un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo conjugado con un agente terapéutico (p.ej., un fármaco o una enzima conversora de profármacos), el agente es activo preferentemente cuando es interiorizado por las células del cáncer a tratar o por las células inmunológicas activadas (p.ej., linfocitos o células dendríticas activadas). En otras realizaciones, el ADC o el derivado de ADC anti-CD70 no se interioriza, y el fármaco es eficaz para eliminar o inhibir las células que expresan CD70 uniéndose a la membrana celular. Aún en otras realizaciones, los ADC de anticuerpos anti-CD70 o los derivados de ADC de los mismos pueden ser guiados a una molécula biológica de una célula (p.ej., un agente inflamatorio) y acumularse en o cerca de las células que secretan o que se unen a la molécula biológica, en donde el agente terapéutico ejerce su efecto (p.ej., un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor).

Para minimizar la actividad del agente terapéutico fuera de las células inmunológicas activadas o de las células cancerosas que expresan CD70, se puede usar un anticuerpo que se une de manera específica al CD70 unido a la membrana celular, pero no al CD70 soluble, de manera que el agente terapéutico se concentra en la superficie celular de la célula inmunológica activada o de la célula cancerosa que expresa CD70. De manera alternativa, en una realización más típica, el agente terapéutico se conjuga de una manera que reduce su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (p.ej., mediante hidrólisis o mediante un agente de escisión). En tales realizaciones, el agente terapéutico se une al anticuerpo o al derivado del mismo con un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el medio intracelular de la célula inmunológica activada o de la célula cancerosa que expresa CD70, pero no es sustancialmente sensible al medio extracelular, de forma que el conjugado se escinde del anticuerpo o del derivado del mismo cuando es interiorizado por la célula inmunológica activada o la célula cancerosa que expresa CD70 (p.ej., en el medio endosómico o, por ejemplo en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a las proteasas, en el medio lisosómico o en una caveola) (véase la Sección III(A), más adelante).

Además, en ciertas realizaciones, el ADC o el derivado de ADC comprende un agente terapéutico que está cargado respecto de la membrana plasmática, por lo que se minimiza adicionalmente la capacidad del agente de cruzar la membrana plasmática una vez interiorizado por una célula. Tal como se usa en la presente memoria, un "agente cargado" significa un agente que (a) está polarizado, de forma que una región del agente tiene una carga respecto de la membrana plasmática, o (b) tiene una carga neta respecto de la membrana plasmática.

Típicamente, el conjugado anticuerpo anti-CD70-fármaco (ADC) o el derivado de ADC está sustancialmente purificado (p.ej., sustancialmente exento de sustancias que limitan su eficacia o que producen efectos secundarios indeseados). En ciertas realizaciones específicas, el ADC o el derivado de ADC anti-CD70 tiene una pureza de un 40%, más típicamente una pureza de alrededor de un 50%, y lo más típicamente una pureza de alrededor de un 60%. En otras realizaciones específicas, el ADC o el derivado de ADC anti-CD70 tiene una pureza de al menos aproximadamente un 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, o 95-98%. En otra realización específica, el ADC o el derivado de ADC anti-CD70 tiene una pureza de aproximadamente un 99%.

A. Enlazadores

Típicamente, el ADC o el derivado de ADC comprende una región enlazadora entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo. Tal como se indicó anteriormente, en las realizaciones típicas, el enlazador es escindible en las condiciones intracelulares, de forma que la escisión del enlazador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el medio intracelular.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el enlazador es escindible mediante un agente de escisión que está presente en el medio intracelular (p.ej., en un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, p.ej., un enlazador de peptidilo que se escinde mediante una peptidasa intracelular o una enzima proteasa, que incluye, pero sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. Típicamente, el enlazador de peptidilo tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión incluyen las catepsinas B y D y la plasmína, las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células seleccionadas como objetivo (véase, p.ej., Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los más típicos son los enlazadores de peptidilo que son escindibles mediante enzimas que están presentes en las células que expresan CD70. Por ejemplo, se puede usar un enlazador de peptidilo que es escindible mediante la proteasa dependiente de tiol catepsina-B, que se expresa mucho en el tejido canceroso (p.ej., un enlazador de Phe-Leu o de Gly-Phe-Leu-Gly). Se describen otros enlazadores, p.ej., en la patente de EE.UU. n° 6.214.345. En las realizaciones específicas, el enlazador de peptidilo escindible mediante una proteasa intracelular es un enlazador de Val-Cit o un enlazador de Phe-Lys (véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador val-cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente generalmente está atenuado cuando está conjugado, y las estabildades séricas de los conjugados típicamente son mayores.

En otras realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil en ácidos que es hidrolizable en el lisosoma (p.ej., una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida de ácido cis-aconítico, ortoéster, acetal, cetel, o similares) (véanse, p.ej. las patentes de EE.UU. n°s 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661). Tales enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables por debajo de un pH 5,5 ó 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, p.ej., un tioéter unido al agente terapéutico por medio de un enlace de acilhidrazona (véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 5.622.929)).

Aún en otras realizaciones, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (p.ej., un enlazador de disulfuro). Se conoce en la técnica una diversidad de enlazadores de disulfuro, que incluyen, por ejemplo, los que se pueden formar mediante el uso de SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo), SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo), SPDB (3-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (véase, p.ej., Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, en *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase además la patente de EE.UU. n° 4.880.935).

Aún en otras realizaciones específicas, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), un enlazador de maleimidobenzoilo (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

Típicamente, el enlazador no es sustancialmente sensible al medio extracelular. Tal como se usa en la presente memoria, "no sustancialmente sensible al medio extracelular", en el contexto de un enlazador, significa que se escinde no más de alrededor de un 20%, típicamente no más de alrededor de un 15%, mas típicamente no más de alrededor de un 10%, y aún más típicamente no más de alrededor de un 5%, no más de alrededor de un 3%, o no más de alrededor de un 1% de los enlazadores, en una muestra de ADC o de derivado de ADC, cuando el ADC o el derivado de ADC está presente en un medio extracelular (p.ej., en el plasma). Se puede determinar si un enlazador no es sustancialmente sensible al medio extracelular, por ejemplo, incubando independientemente con plasma (a) el ADC o el derivado de ADC (la "muestra de ADC") y (b) una cantidad equimolar de anticuerpo sin conjugar o de agente terapéutico (la "muestra de control") durante un período de tiempo predeterminado (p.ej., 2, 4, 8, 16, ó 24 horas), y después comparando la cantidad de anticuerpo sin conjugar o de agente terapéutico presente en la muestra de ADC con la que está presente en la muestra de control, tal como se mide, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

En otras realizaciones no excluyentes mutuamente, el enlazador estimula la interiorización celular. En ciertas realizaciones, el enlazador estimula la interiorización celular cuando está conjugado con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto de enlazador-agente terapéutico del ADC o del derivado de ADC tal como se describe en la presente memoria). Aún en otras realizaciones, el enlazador estimula la interiorización celular cuando está conjugado tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo anti-CD70 o el derivado del mismo (es decir, en el medio del ADC o del derivado de ADC tal como se describe en la presente memoria).

Una diversidad de enlazadores que se pueden usar con las presentes composiciones y métodos se describen en el documento WO 2004010957 titulado "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease" presentado el 31 de julio de 2003.

En ciertas realizaciones, la unidad enlazadora tiene la siguiente fórmula general:



5

en la que:

-T- es una unidad extensora;

a es 0 ó 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos;

10 w es independientemente un número entero que oscila de 2 a 12;

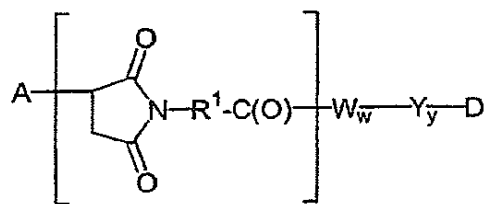
-Y- es una unidad espaciadora; y

y es 0, 1 ó 2.

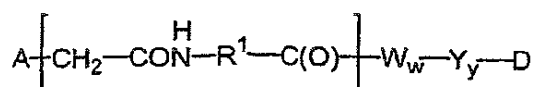
1. La unidad extensora

15 La unidad extensora (-T-), cuando está presente, une la unidad de anticuerpo anti-CD70 con la unidad de aminoácidos (-W-). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo anti-CD70, de manera natural o por medio de la manipulación química, incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo anti-CD70. De manera alternativa, se pueden generar grupos sulfhidrilo mediante la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un anticuerpo anti-CD70 con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos que generan grupos sulfhidrilo. En las realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo recombinante, y se modifica para que porte una o más lisinas. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 recombinante se modifica para que porte grupos sulfhidrilo adicionales, p.ej., cisteínas adicionales.

25 En ciertas realizaciones específicas, la unidad extensora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo anti-CD70. El átomo de azufre puede proceder de un grupo sulfhidrilo (-SH) de un anticuerpo anti-CD70 reducido (A). Las unidades extensoras representativas de estas realizaciones se representan entre los corchetes de las Fórmulas (Ia) y (Ib; véase más adelante), en las que A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente, y R¹ se selecciona de -alquileo C₁-C₁₀-, -carbociclo C₃-C₈-, -O-(alquil C₁-C₈)-, -arileno-, -alquilen C₁-C₁₀-arileno-, -arilen-alquileo C₁-C₁₀-, -alquilen C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquilen C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r-, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que oscila de 1-10.

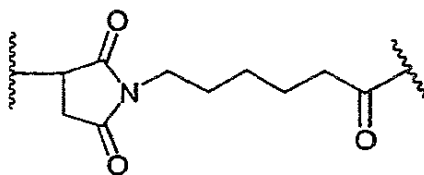


(Ia)

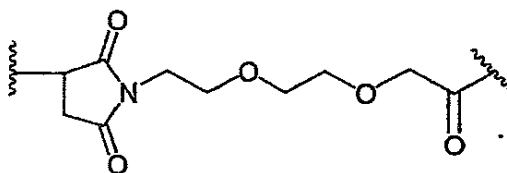


(Ib)

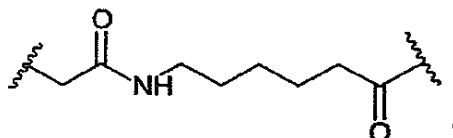
Una unidad extensora ilustrativa es la de fórmula (Ia) en la que R¹ es -(CH₂)₅-:



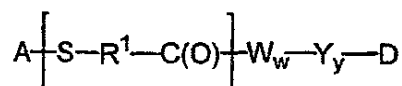
Otra unidad extensora ilustrativa es la de fórmula (Ia) en la que R¹ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂- y r es 2:



5 Aún otra unidad extensora ilustrativa es la de fórmula (Ib) en la que R¹ es -(CH₂)₅-:

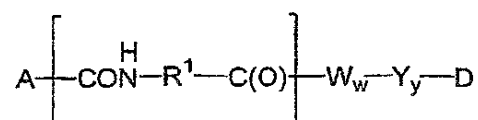


10 En otras realizaciones específicas, la unidad extensora está unida a la unidad de anticuerpo anti-CD70 (A) por medio de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo anti-CD70 y un átomo de azufre de la unidad extensora. Una unidad extensora representativa de esta realización se representa entre corchetes en la Fórmula (II), en la que R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente.



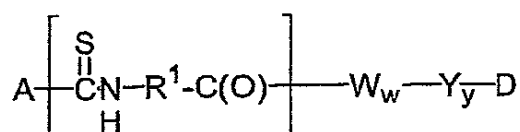
(II)

15 En otras realizaciones específicas, el grupo reactivo de la unidad extensora contiene un sitio reactivo que puede ser reactivo con un grupo amino de un anticuerpo anti-CD70. El grupo amino puede ser el de una arginina o una lisina. Los sitios reactivos amino adecuados incluyen, pero sin limitación, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades extensoras representativas de estas realizaciones se representan entre los corchetes de las Fórmulas (IIIa) y (IIIb), en las que R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente;

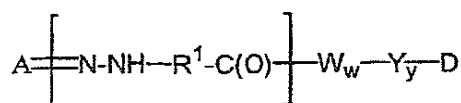


(IIIa)

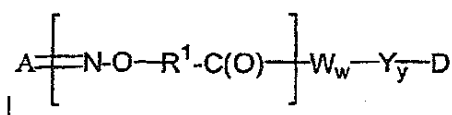
(IIIb)



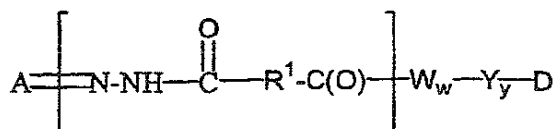
Aún en otro aspecto, la función reactiva de la unidad extensora contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo carbohidrato modificado que puede estar presente en un anticuerpo anti-CD70. En una realización específica, el anticuerpo anti-CD70 se glicosila enzimáticamente para proporcionar un resto de carbohidrato. El carbohidrato se puede oxidar suavemente con un reactivo tal como peryodato sódico, y la unidad de carbonilo resultante del carbohidrato oxidado se puede condensar con una unidad extensora que contiene un grupo funcional tal como una hidrazida, una oxima, una amina reactiva, una hidrazina, una tiosemicarbazida, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como las descritas en Kaneko *et al.*, 1991, *Bioconjugate Chem* 2:133-41. Las unidades extensoras representativas de esta realización se representan entre los corchetes de las Fórmulas (IVa)-(IVc), en las que R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente.



(IVa)



(IVb)

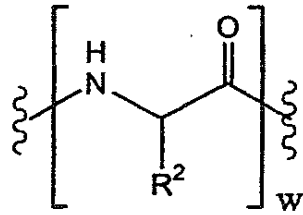


(IVc)

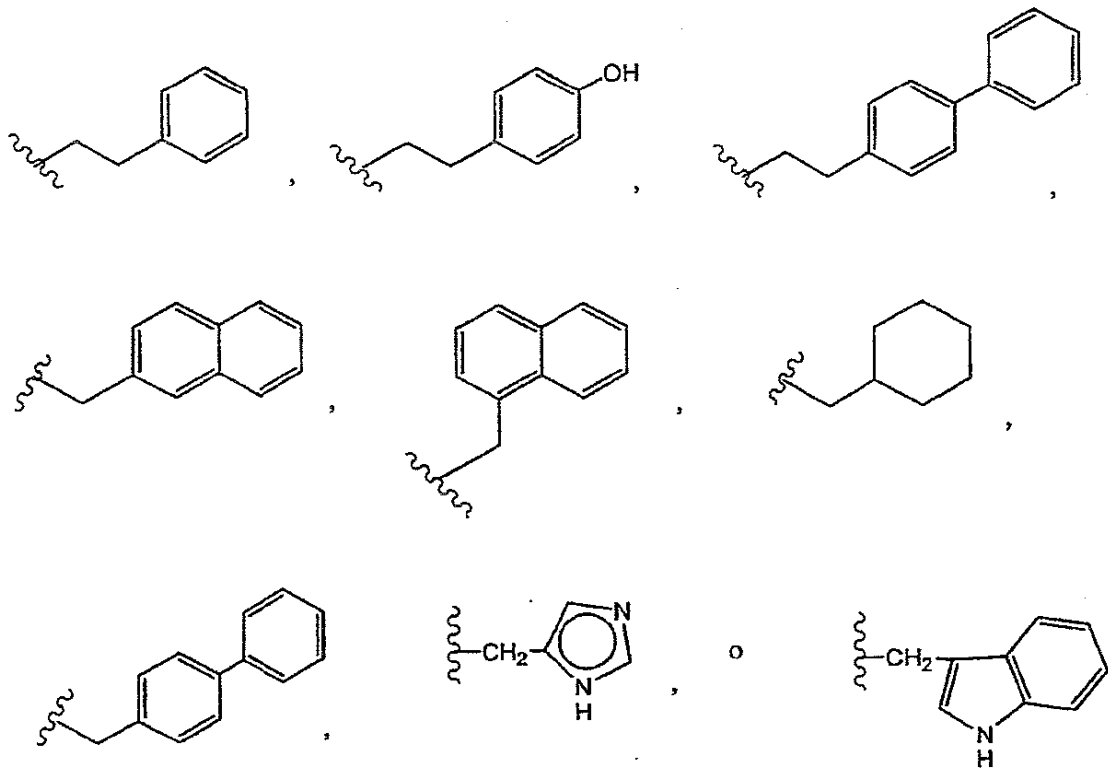
2. La Unidad de Aminoácidos

La unidad de aminoácidos (-W-) une la unidad extensora (-T-) con la unidad espaciadora (-Y-) si la unidad espaciadora está presente, y une la unidad extensora al agente citotóxico o citostático (unidad de fármaco; D) si la unidad espaciadora no está presente.

-W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula indicada más adelante entre corchetes, y w es un número entero que oscila de 2 a 12:

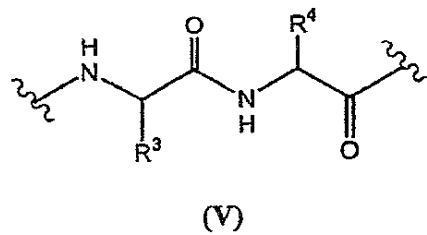


5 en la que R² es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,

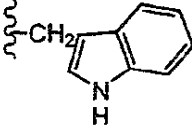


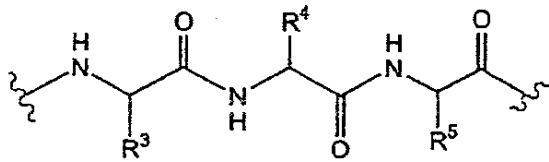
10 La unidad de aminoácidos de la unidad enlazadora se puede escindir enzimáticamente mediante una enzima que incluye, pero sin limitación, una proteasa asociada a tumores, para liberar la unidad de fármaco (-D) que se protona *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco citotóxico (D).

Las unidades W_w ilustrativas se representan mediante las fórmulas (V)-(VII):



en las que R³ y R⁴ son los siguiente:

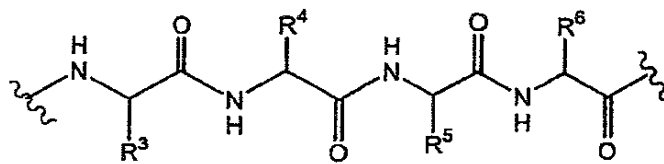
R ³	R ⁴
Bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Metilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
Bencilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
Isobutilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
sec-butilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
Bencilo	metilo; y
Bencilo	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ;



(VI)

en la que R³, R⁴ y R⁵ son lo siguiente:

R ³	R ⁴	R ⁵
Bencilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ; y
H	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;



(VII)

5 en la que R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son lo siguiente:

R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
H	Bencilo	isobutilo	H; e
metilo	Isobutilo	metilo	isobutilo.

Las unidades de aminoácidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, unidades de fórmula (V) en las que: R³ es bencilo y R⁴ es -(CH₂)₄NH₂; R³ es isopropilo y R⁴ es -(CH₂)₄NH₂; o R³ es isopropilo y R⁴ es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otra

unidad de aminoácidos adecuada es una unidad de fórmula (VI), en la que: R³ es bencilo, R⁴ es bencilo, y R⁵ es -(CH₂)₄NH₂.

5 Las unidades -W_w- se pueden diseñar y optimizar en cuanto a su selectividad hacia la escisión enzimática por una proteasa particular asociada a tumores. Las unidades -W_w- adecuadas son aquellas cuya escisión está catalizada por las proteasas, catepsina B, C y D, y plasmina.

En una realización, -W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido o tetrapéptido.

Cuando R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que está unido R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ es quiral.

Cada átomo de carbono al que está unido R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ está independientemente en la configuración (S) o (R).

10 En una cierta realización, la unidad de aminoácidos es un dipéptido de fenilalanina-lisina (enlazador Phe-Lys o FK). En otra realización, la unidad de aminoácidos es un dipéptido de valina-citrulina (enlazador Val-Cit o VC).

3.La Unidad Espaciadora

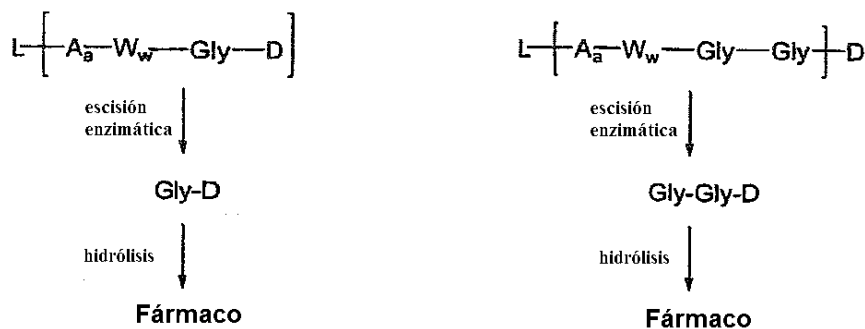
15 La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de aminoácidos a la unidad de fármaco. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autodestructivas y no autodestructivas. Una unidad espaciadora no autodestructiva es una en la que todo o parte de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad de fármaco tras la escisión enzimática de una unidad de aminoácidos del conjugado anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco o del compuesto fármaco-enlazador. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autodestructiva incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora (glicocola-glicocola) y una unidad espaciadora de glicocola (ambas representadas en el Esquema 1). Cuando un conjugado anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco que contiene una

20 unidad espaciadora de glicocola-glicocola o una unidad espaciadora de glicocola sufre escisión enzimática por medio de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, se escinde en un resto glicocola-glicocola-fármaco o un resto glicocola-fármaco de A-T-W_w-. Para liberar el fármaco, debería tener lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula seleccionada como objetivo para escindir el enlace de la unidad glicocola-fármaco.

25 En una realización típica, -Y- es un éter *p*-aminobencílico que puede estar sustituido con Q_m, en el que Q es -alquilo C₁-C₈, -alcoxi C₁-C₈, -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que oscila de 0-4.

Esquema 1

En una realización, una unidad espaciadora no autodestructiva (-Y-) es -Gly-Gly-.

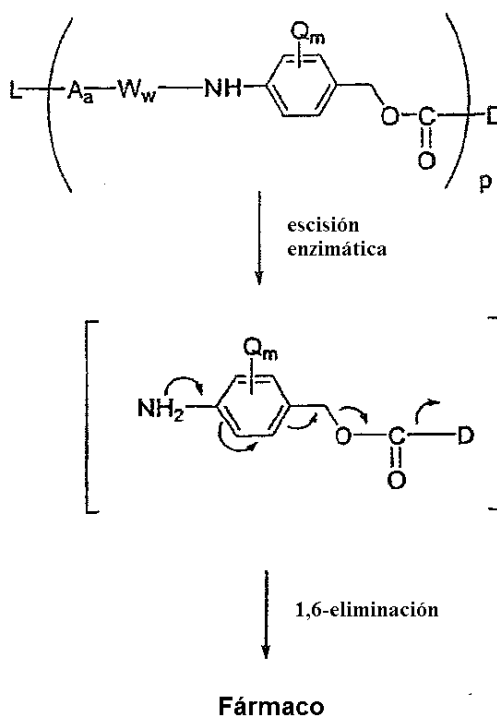


30 En otra realización, una unidad espaciadora no autodestructiva (-Y-) es -Gly-.

En una realización, el compuesto fármaco-enlazador o un conjugado anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco carece de una unidad espaciadora (y=0).

35 De manera alternativa, un conjugado anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco que contiene una unidad espaciadora autodestructiva puede liberar el fármaco (D) sin la necesidad de una etapa de hidrólisis distinta. En estas realizaciones, -Y- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB) que está unida a -W_w- por medio del átomo de nitrógeno del grupo PAB, y que está conectada directamente a -D por medio de un grupo carbonato, carbamato o éter (Esquema 2 y Esquema 3).

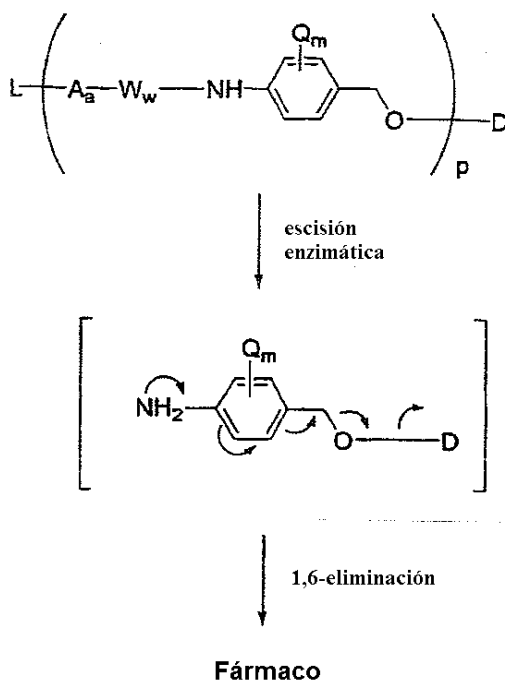
Esquema 2



en las que Q es -alquilo C₁-C₈, -alcoxi C₁-C₈, -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; y p es un número entero que oscila de 1-20.

5

Esquema 3



en las que Q es -alquilo C₁-C₈, -alcoxi C₁-C₈, -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; y p es un número entero que oscila de 1-20.

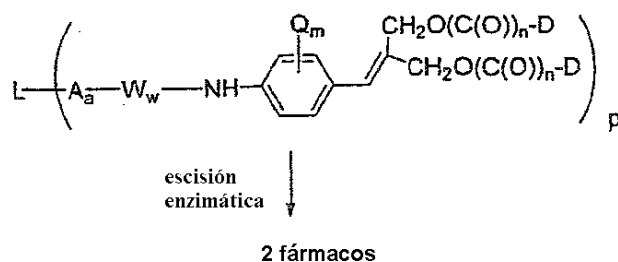
10 Otros ejemplos de espaciadores autodestructivos incluyen, pero sin limitación, los compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB tales como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237 para los ejemplos) y orto- o para-aminobencilacetales. Se pueden usar

5 espaciadores que sufren una ciclación fácil tras la hidrólisis del enlace amida, tales como las amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y sin sustituir (Rodríguez *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas cíclicos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos de manera apropiada (Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). La eliminación de los fármacos que contienen aminas que están sustituidos en la posición α de la glicocola (Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) son también ejemplos de estrategias con espaciadores autodestructivos que se pueden aplicar a los conjugados anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco.

En una realización alternativa, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) (Esquema 4), que se puede usar para incorporar fármacos adicionales.

10

Esquema 4

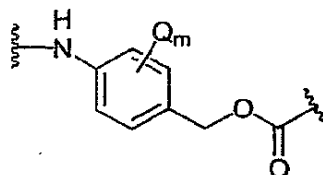


en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -alcoxi C₁-C₈, -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; n es 0 ó 1; y p es un número entero que oscila de 1-20.

En una realización, los dos restos -D son el mismo.

15 En otra realización, los dos restos -D son diferentes.

Se representan unidades espaciadoras típicas (-Y_y-) en las Fórmulas (VIII)-(X):

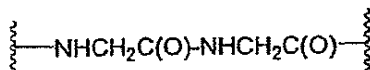


(VIII)

en la que Q es alquilo C₁-C₈, alcoxi C₁-C₈, halógeno, nitro o ciano; y m es un número entero que oscila de 0-4;



(IX); y



(X)

20 B. Agentes Terapéuticos

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, se puede usar cualquier agente que ejerza un efecto terapéutico sobre las células inmunológicas activadas o las células cancerosas como agente terapéutico para la conjugación con un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo (véase, p.ej., el documento WO 2004/010957,

"Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease" (anteriormente mencionado). Típicamente, el agente terapéutico es un agente citotóxico o inmunosupresor.

Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunosupresores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (p.ej., complejos de platino tales como *cis*-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores a la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformantes, antimetabolitos de purina, puomicinas, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasas, alcaloides de la vinca, o similares.

Los agentes citotóxicos o inmunosupresores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfano, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecano, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalano, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, estreptoizotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecano, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

En ciertas realizaciones típicas, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (p.ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (p.ej., enedífinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (p.ej., paclitaxel y docetaxel), puomicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, y mitoxantrona.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterápico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalano, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, se pueden unir agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina, y palitoxina a los anticuerpos anti-CD70 o los derivados de los mismos.

En las realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocido en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, p.ej., un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar la auristatina E con ácido para-acetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y la estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en las solicitudes de patentes de EE.UU. n°s 09/845.786 (publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20030083263) y 10/001.191 (publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20050009751); la solicitud de patente internacional n° PCT/US03/24209 (n° de publicación WO2004/010957), la solicitud de patente internacional n° PCT/US02/13435 (n° de publicación WO20021088172), y las pat. de EE.UU. n°s 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En las realizaciones específicas, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN (véase, p.ej., la pat. de EE.UU. n° 6.130.237). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enedíina (p.ej., caliqueamicina).

En ciertas realizaciones, el ADC o el derivado de ADC comprende un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero sin limitación, taxanos (p.ej., Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (p.ej., vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina), y dolastatinas (p.ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (p.ej., epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, y eleuterobina.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en las realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase además Chari *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52:127-131).

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (p.ej. azatioprina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (p.ej., metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, foscarnet, o trifluridina.

En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es tacrólimus, ciclosporina o rapamicina. En las realizaciones adicionales, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina,

5 amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoetina alfa, Denileucina diftotox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, Epoetina alfa, estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, Interferon α -2a, irinotecan, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza nitrogenada, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvekin, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobroman, plicamicina, porfimer sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, Rituximab, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

10 En las realizaciones adicionales, el fármaco es un anticuerpo monoclonal anti HER2 humanizado, RITUXAN (rituximab; Genentech; un anticuerpo monoclonal anti CD20 quimérico); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD; Campath I/H (Leukosite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado); LymfoCide™ (Immunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado); Oncolym™ (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-Dr10 murino radiomarcado); Allomune (BioTransplant, CA; un mAb anti-CD2 humanizado); Avastin™ (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo anti-VEGF humanizado); Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); y CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado).

25 Otros anticuerpos adecuados incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfa fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico prostático, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor anti transferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, antígeno específico prostático, receptor de IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P21, MPG, y el producto del oncogen Neu.

30 En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil or metotrexato. Alternativamente, el agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (v.g., cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (v.g., prednisona o desametasona).

En ciertas realizaciones típicas, el agente inmunosupresor es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de ciclooxigenasa, inhibidores de 5-lipoxigenasa y antagonistas de receptores de leucotrienos.

35 Los inhibidores de ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenaco, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindaco, tenoxicam, tolmetina, and ácido acetilsalicílico.

40 Los inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores redox (v.g., derivados de catecol butano, ácido nordihidroguayarático (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopaleno, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no-redox (e.g., hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y derivados de los mismos, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinametoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de inhibidores redox.

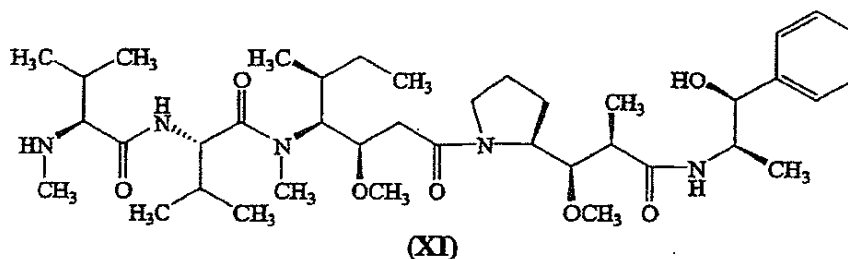
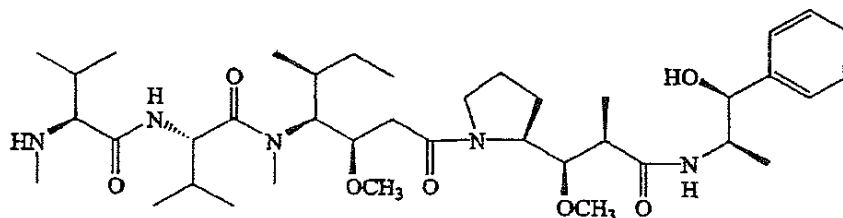
45 Otros inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (v.g., fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos naturales que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranos, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (v.g., ácidos hidroxámicos y derivados de los mismos; N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileuton, ácido 5-hidroxiantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (v.g., ketoconazol e itraconazol), fenotiazinas, y derivados de benzopirano.

55 Otros inhibidores de liposigenasa también adecuados incluyen los inhibidores de eicosanoides (v.g., ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico docosahexaenoico y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxi-eicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxi-eicosapentaenoico, y leukotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfieren con flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamil, fuscósida, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapaleno, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).

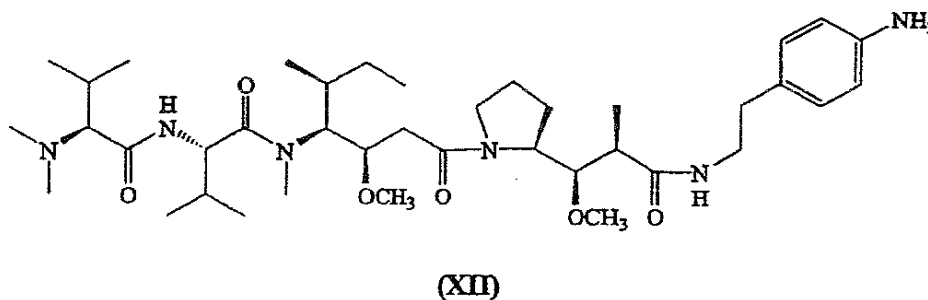
Los antagonistas de receptores de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, 5 SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

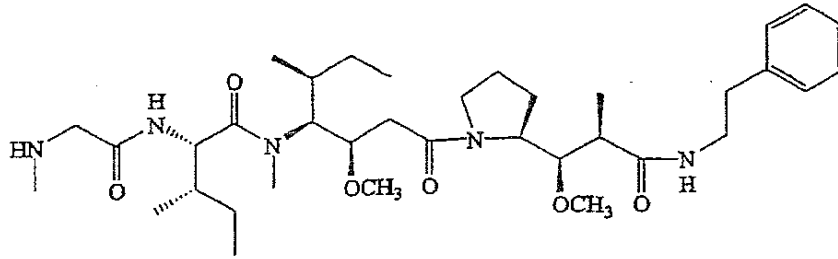
1. Fármacos de Dolastatina

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina. En las realizaciones más específicas, la dolastatina es de la clase de las auristatinas. Tal como se usa en la presente memoria, el término dolastatina abarca las auristatinas naturales y los derivados que no son naturales, por ejemplo MMAE. Así, en una realización 15 específica, el agente citotóxico o citostático es MMAE (Fórmula XI). En otra realización específica, el agente citotóxico o citostático es AFP (Fórmula XVI).

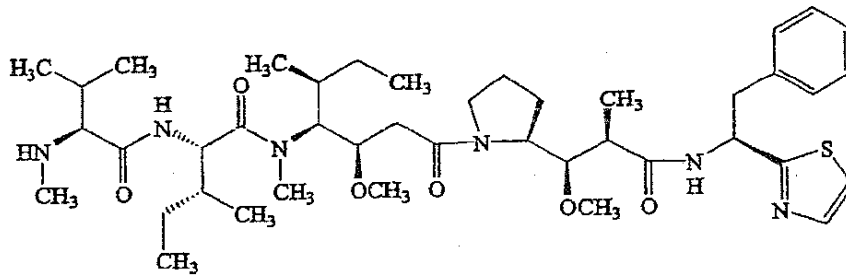


En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina de las fórmulas XII-XXI.

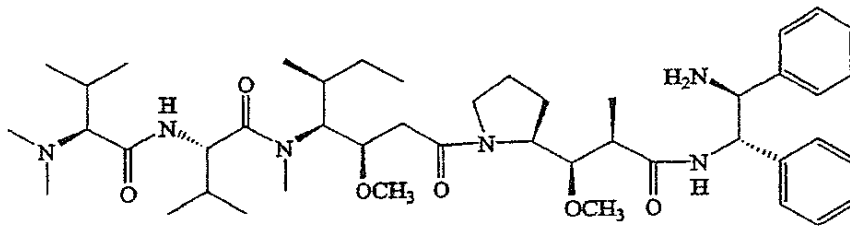




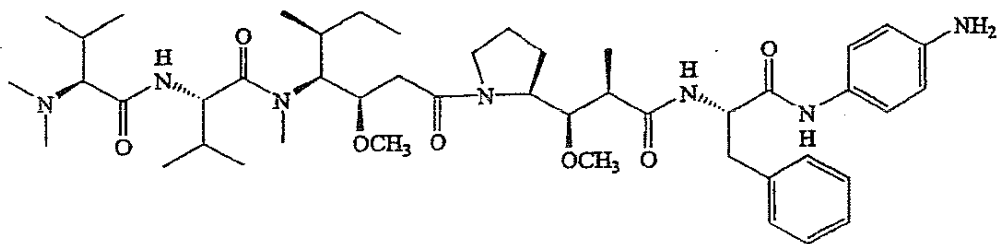
(XIII)

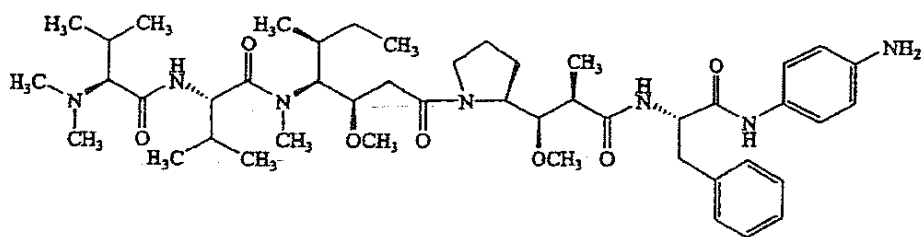


(XIV)

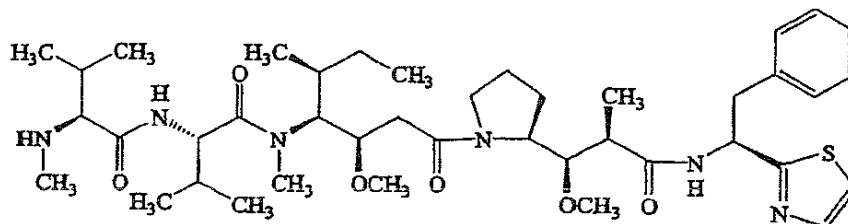


(XV)

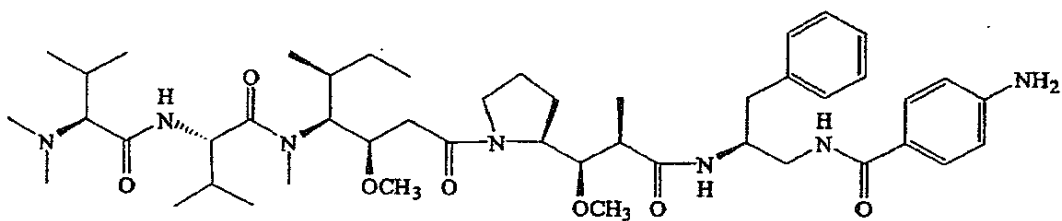




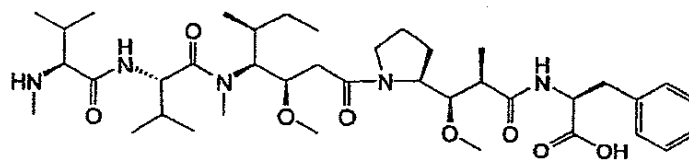
(XVI)



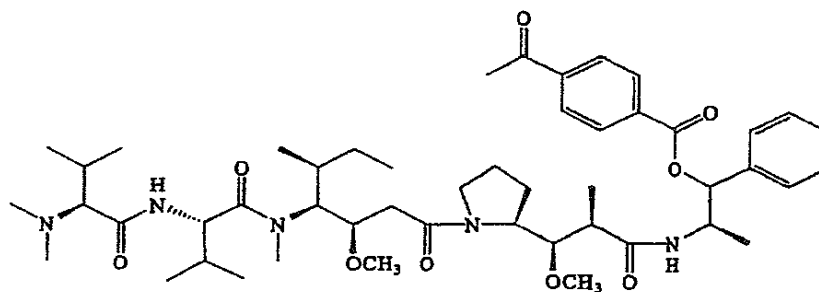
(XVII)



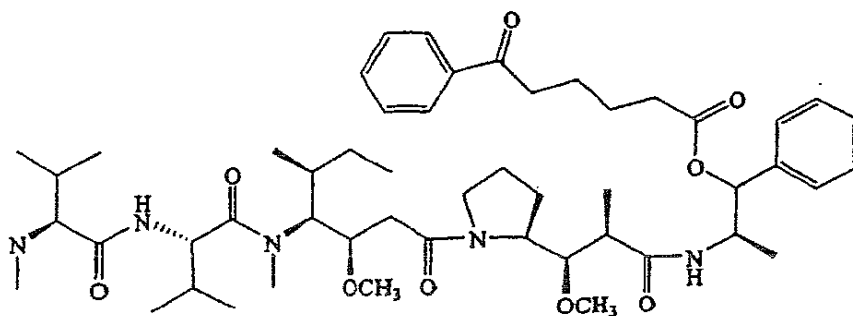
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

C. Formación de ADCs Anti-CD70 y Derivados de ADCs

- La generación de ADCs anti-CD70 y de derivados de ADCs se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida para el experto. Brevemente, los ADCs anti-CD70 comprenden un anticuerpo anti-CD70, un fármaco, y opcionalmente un enlazador que une el fármaco y el anticuerpo. Están disponibles varias reacciones diferentes para la unión covalente de los fármacos a los anticuerpos. Esto se lleva a cabo a menudo mediante la reacción de los residuos de aminoácidos de la molécula de anticuerpo, que incluyen los grupos amina de la lisina, los grupos de ácido carboxílico libres de los ácidos glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de la cisteína y los diversos restos de aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos inespecíficos usados más habitualmente de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxilo (o amino) de un compuesto con grupos amino (o carboxilo) del anticuerpo. Además, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto con los grupos amino de la molécula de anticuerpo. También está disponible para la unión de los fármacos a los anticuerpos la reacción mediante una base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, por lo que se forma un aldehído que se hace reaccionar después con la molécula de anticuerpo. La unión se da por medio de la formación de una base de Schiff con grupos amino de la molécula de anticuerpo. También se pueden usar isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir de manera covalente los fármacos con los anticuerpos. El experto conoce otras técnicas, y están dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de tales técnicas se describen, p.ej., en las pat. de EE.UU. n°s 5.665.358; 5.643.573; y 5.556.623.
- En ciertas realizaciones, un intermedio, que es el precursor del enlazador, se hace reaccionar con el fármaco en condiciones apropiadas. En ciertas realizaciones, se usan grupos reactivos del fármaco y/o del intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo anti-CD70 en condiciones apropiadas.

IV. Otros Restos de Selección de CD70 y Conjugados Proteína-Fármaco

- Tal como se indicó anteriormente, en otras realizaciones, no es necesario que el resto que se dirige a CD70 sea un anticuerpo para que sea útil de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Por lo tanto, un resto que se dirige a CD70 puede incluir una o más CDRs de un anticuerpo que se une a CD70 y que elimina o inhibe la proliferación de las células que expresan CD70 cuando se conjuga con un agente citotóxico, o de un anticuerpo que se une a CD70 y ejerce un efecto inmunosupresor cuando se conjuga con un agente inmunosupresor. Típicamente, la proteína es un multímero, más típicamente un dímero.

Además, las proteínas de unión a CD70 útiles de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen las proteínas de fusión, es decir, las proteínas que están fusionadas de manera recombinante o que están conjugadas químicamente (lo que incluye la conjugación tanto covalente como no covalente) con proteínas heterólogas (típicamente de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 aminoácidos). La fusión no tiene por qué ser necesariamente directa, sino que puede darse por medio de secuencias enlazadoras.

Por ejemplo, los restos que se dirigen a CD70 útiles en los presentes métodos se pueden producir de manera recombinante fusionando la región codificante de una o más de las CDRs de un anticuerpo anti-CD70 en el marco de lectura con una secuencia codificante de una proteína heteróloga. La proteína heteróloga puede proporcionar una o más de las siguientes características: beneficios terapéuticos añadidos; favorecer la expresión estable; proporcionar un medio para facilitar una expresión recombinante de alto rendimiento; y/o proporcionar un dominio de multimerización.

En otros aspectos, los restos que se dirigen a CD70 pueden incluir CD27 y variantes o fragmentos de los mismos que se unen a CD70. Los restos que se dirigen a CD70 pueden incluir además péptidos, ligandos y otras moléculas que se unen de manera específica a CD70.

Los restos que se dirigen a CD70 útiles en los métodos descritos en la presente memoria se pueden identificar mediante el uso de cualquier método adecuado para el cribado de las interacciones proteína-proteína. Típicamente, las proteínas se identifican inicialmente por su capacidad de unirse de manera específica a CD70, y después por su capacidad de producir un efecto citostático o citotóxico sobre los linfocitos activados o sobre las células cancerosas que expresan CD70 cuando se conjugan con un agente citotóxico o citostático, o un efecto inmunosupresor sobre una célula inmunológica cuando se conjugan con un agente inmunosupresor. Entre los métodos tradicionales que se pueden emplear están las técnicas de "clonación por interacción", que suponen el análisis con sondas de bibliotecas de expresión con CD70 marcado de una manera similar a la técnica de análisis con sondas de anticuerpos de las bibliotecas de λ gt11. A modo de ejemplo y no de limitación, esto se puede llevar a cabo como sigue: se modifica un clon de cADN que codifica CD70 (o un dominio de unión de 1F6 ó 2F2 del mismo) en el extremo insertando el sitio de fosforilación para la quinasa de músculo cardíaco (HMK) (véase, p.ej., Blonar y Rutter, 1992, *Science* 256:1014-1018). La proteína recombinante se expresa en *E. coli* y se purifica en una columna de afinidad de GDP hasta homogeneidad (Edery *et al.*, 1988, *Gene* 74:517-525) y se marca mediante el uso de 32 P-ATP y quinasa de músculo cardíaco bovino (Sigma) hasta una actividad específica de 1×10^8 cpm/ μ g, y se usa para cribar una biblioteca de cADN de λ gt11 de placenta humana en un "ensayo Far-Western" (Blonar y Rutter, 1992, *Science* 256:1014-1018). Se aíslan las placas que interaccionan con la sonda de CD70. Los insertos de cADN de las placas λ -positivas se liberan y se subclonan en un vector adecuado para la secuenciación, tal como pBluescript KS (Stratagene).

Se describe con detalle un método que detecta las interacciones proteicas *in vivo*, el sistema de doble híbrido, con fines ilustrativos solamente, y no a modo de limitación. Se ha descrito una versión de este sistema (Chien *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582) y está disponible comercialmente de Clontech (Palo Alto, CA).

Una vez que se identifica la proteína de unión a CD70, se determina su capacidad (sola o cuando está multimerizada o fusionada con un dominio de dimerización o multimerización) para ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre las células cancerosas que expresan CD70 (cuando se conjuga con un agente citotóxico) o un efecto inmunosupresor sobre una célula inmunológica que expresa CD70 (cuando se conjuga con un agente inmunosupresor) mediante los métodos descritos más adelante.

V. Ensayos de las Actividades Citotóxicas, Citostáticas e Inmunosupresoras

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un ADC o un derivado de ADC anti-CD70 ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula cancerosa que expresa CD70, o un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre una célula inmunológica que expresa CD70 activada (v.g., una célula dendrítica o un linfocito activado). Los linfocitos activados que se pueden ensayar en función del efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor de un ADC anti-CD70 o de un derivado de ADC pueden ser líneas celulares cultivadas (p.ej., CESS, que están disponibles de la ATCC; o KMH2 y L428, que están disponibles de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), o de linfocitos preparados a partir de una muestra de sangre reciente o de otras fuentes. Los linfocitos se pueden activar mediante las mezclas apropiadas de anticuerpos y citocinas. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden activar mediante el uso de células estimuladoras alogénicas o células presentadoras de antígenos autólogas pulsadas con antígenos, y los clones de células T se pueden activar mediante PHA y citocinas en presencia de células de soporte, tal como se describe en el Ejemplo 9, más adelante. Las células cancerosas que expresan CD70 que se pueden ensayar en busca de un efecto citotóxico pueden ser líneas celulares cultivadas tal como se describe en el Ejemplo 7, más adelante, o de células cancerosas que expresan CD70 preparadas a partir de un sujeto.

Una vez que se confirma que un ADC anti-CD70 o derivado de ADC ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre las células cancerosas que expresan CD70 o un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células inmunológicas activadas, su efecto terapéutico se puede validar en un modelo animal. Los modelos animales ejemplares de trastornos inmunológicos o de cánceres que expresan CD70 se describen en la Sección VI, más adelante.

Se conocen los métodos para determinar si un agente ejerce un efecto citostático o citotóxico sobre una célula. Los ejemplos ilustrativos de tales métodos se describen más adelante.

Para determinar si un ADC o un derivado de ADC anti-CD70 ejerce un efecto citostático sobre las células inmunológicas activadas o sobre las células cancerosas que expresan CD70, se puede usar un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, se pueden cultivar células inmunológicas activadas (p.ej., linfocitos activados) o células cancerosas que expresan CD70 a una densidad de 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un período de 72 horas y exponerlas a 0,5 μ Ci de 3 H-timidina durante las 8 horas finales del período de 72 horas, y se mide la incorporación de 3 H-timidina en las células del cultivo en presencia y ausencia del ADC o del derivado de ADC.

Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis va acompañada generalmente por una permeabilidad incrementada de la membrana plasmática; el hinchamiento de la célula, y la ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza generalmente por la formación de ampollas en la membrana, la condensación del citoplasma, y la activación de las endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células inmunológicas activadas o en las células cancerosas

que expresan CD70 indica que un ADC o un derivado de ADC anti-CD70 es útil en el tratamiento o en la prevención de trastornos inmunológicos y de cánceres que expresan CD70.

La viabilidad celular se puede medir determinando en una célula la absorción de un colorante tal como rojo neutro, azul tripán, o azul ALAMAR™ (véase, p.ej., Page *et al.*, 1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476). En tal ensayo, se incuban las células en medios que contienen el colorante, se lavan las células, y el colorante restante, que refleja la absorción celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. También se puede usar el colorante de unión a proteínas sulforodamina B (SRB) para medir la citotoxicidad (Skehan *et al.*, 1990, *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12).

De manera alternativa, se usa una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo de la supervivencia y la proliferación de células mamíferas detectando las células vivas, y no las células muertas (véase, p.ej., Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

La apoptosis se puede cuantificar midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Hay disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales ensayos, que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en el ADN fragmentado) y los ensayos basados en ELISA, se describen en *Biochemica*, 1999, nº 2, págs. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

La apoptosis se puede determinar también midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con la necrosis, se puede determinar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática midiendo la absorción de ciertos colorantes (p.ej., un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Se ha descrito previamente un método para medir el número de células apoptóticas en Duke y Cohen, *Current Protocols In Immunology* (Coligan *et al.* eds., 1992, págs. 3.17.1-3.17.16). Las células se pueden marcar también con un colorante de ADN (p.ej., naranja de acridina, bromuro de etidio, o yoduro de propidio) y se observa la condensación de la cromatina en las células y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que se pueden medir para determinar la apoptosis incluyen, p.ej., la condensación citoplasmática, la formación incrementada de ampollas en la membrana, y la contracción celular.

La presencia de células apoptóticas se puede medir tanto en los compartimentos unidos como en los compartimentos "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, se pueden recoger ambos compartimentos extrayendo el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, combinando las preparaciones tras una etapa de lavado y centrifugación (p.ej., 10 minutos, 2000 rpm), y detectando la apoptosis (p.ej., midiendo la fragmentación del ADN) (véase, p.ej., Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Los efectos inmunosupresores se pueden medir, por ejemplo, determinando un efecto citotóxico o citostático (como se ha descrito más arriba) sobre una célula inmunológica activada que está implicada en la estimulación de respuestas inmunitarias (v.g., células T citotóxicas CD8⁺, células Th1 CD4⁺, células B o células dendríticas maduras). Además o alternativamente, se puede determinar un efecto inmunosupresor por examen de la presencia o ausencia de poblaciones de células inmunológicas específicas (usando, v.g., citometría de flujo) tal como, por ejemplo, la presencia de células T reguladoras implicadas en la supresión de una respuesta inmunológica; medición de la capacidad funcional de las células inmunológicas, incluyendo, v.g., la capacidad citolítica de las células T citotóxicas; mediciones de las citocinas, quimocinas, moléculas de la superficie celular, anticuerpos u otras moléculas secretadas o en la superficie celular de las células (v.g., por citometría de flujo, por ensayos de inmunoabsorción enzimática, análisis de transferencia Western, análisis de micromatrices de proteínas, análisis por inmunoprecipitación); o medición de marcadores bioquímicos de activación de células inmunológicas o rutas señaladoras dentro de células inmunológicas (v.g., análisis por transferencia Western e inmunoprecipitación de fosforilación de tirosina, serina o treonina, escisión de polipéptidos y formación o disociación de complejos con proteínas; análisis de matrices de proteínas; perfilado transcripcional de ADN usando matrices de ADN o hibridación substractiva).

VI. Modelos Animales de Trastornos Inmunológicos o Cánceres que Expresan CD70

Los ADC o los derivados de ADC anti-CD70 se pueden ensayar o validar en modelos animales de trastornos inmunológicos o de cánceres que expresan CD70. El experto conoce varios modelos animales establecidos de trastornos inmunológicos o de cánceres que expresan CD70, cualquiera de los cuales se puede usar para ensayar la eficacia del ADC o del derivado de ADC. Los ejemplos no limitantes de tales modelos se describen más adelante.

Algunos ejemplos de modelos animales de enfermedades autoinmunes sistémicas y específicas de órgano, incluyendo la diabetes, el lupus, la esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgren, la encefalomielitis autoinmune experimental (esclerosis múltiple), la tiroiditis, miastenia gravis, artritis, uveítis, enfermedad inflamatoria intestinal han sido descritos por Bigazzi, "Animal Models of Autoimmunity: Spontaneous and Induced," en *The Autoimmune Diseases* (Rose & Mackay eds., Academic Press, 1998) y en "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease," en *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.* eds., Wiley & Sons, 1997).

Las enfermedades alérgicas, por ejemplo, el asma y la dermatitis, también pueden ser modeladas en roedores. La hipersensibilidad de las vías respiratorias puede ser inducida en ratones por ovoalbúmina (Tomkinson *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:5792-5800) o antígenos de los huevos de *Schistosoma mansoni* (Tesciuba *et al.*, 2001, *J. Immunol.*

167:1996-2003). La cepa Nc/Nga de ratones muestra un notable aumento de IgE sérica y desarrolla espontáneamente lesiones similares a dermatitis atópica (Vestergaard et al., 2000, *Mol. Med. Today* 6:209-210; Watanabe et al., 1997, *Int. Immunol.* 9:461-466; Saskawa et al., 2001, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126:239-247).

5 La inyección de linfocitos donadores inmuno-competentes en un huésped histo-incompatible es una estrategia clásica para inducir GVHD aguda en ratones. Alternativamente, el modelo murino B6D2F1 parental proporciona un sistema para inducir GVHD tanto aguda como crónica. En este modelo los ratones B6D2F1 son progenie F1 de un cruce entre las cepas parentales de C57BL/6 y ratones DBA/2. La transferencia de células linfoides de DBA/2 a ratones B6D2F1 no irradiados causa GVHD crónica, mientras que la transferencia de células linfoides C57BL/6, C57BL/10 o B10.D2 causa GVHD aguda (Slayback et al., 2000, *Bone Marrow Transpl.* 26:931-938; Kataoka et al., 10 2001, *Immunology* 103:310-318).

Adicionalmente, tanto las células madre hematopoyéticas humanas como las células linfoides maduras de sangre periférica se pueden injertar en ratones SCID, y estas células linfo-hematopoyéticas humanas siguen siendo funcionales en los ratones SCID. (McCune et al., 1988, *Science* 241:1632-1639; Kamel-Reid y Dick, 1988, *Science* 242:1706-1709; Mosier et al., 1988, *Nature* 335:256-259). Esto ha proporcionado un sistema modélico con animales 15 pequeños para el ensayo directo de agentes terapéuticos potenciales sobre células linfoides humanas. (Véase, v.g., Tournoy et al., 2001, *J. Immunol.* 166:6982-6991).

Además, se pueden crear modelos con animales pequeños para examinar las eficacias *in vivo* de los ADCs anti-CD70 o de los derivados de ADC implantando líneas celulares de tumores humanos que expresan CD70 en cepas de roedores inmunodeficientes apropiados, p.ej., ratones atímicos o ratones SCID. Los ejemplos de líneas celulares de linfoma humano que expresan CD70 incluyen, por ejemplo, Daudi (Ghetie et al., 1994, *Blood* 83:1329-36; Ghetie et al., 1990, *Int J Cancer* 15:481-5; de Mont et al., 2001, *Cancer Res* 61:7654-59), Ramos (Ma et al., 2002, *Leukemia* 16:60-6; Press et al., 2001, *Blood* 98:2535-43), HS-Sultan (Cattan y Maung, 1996, *Cancer Chemother Pharmacol* 38:548-52; Cattan y Douglas, 1994, *Leuk Res* 18:513-22), Raji (Ochakovskaya et al., 2001, *Clin Cancer Res* 7:1505-10; Breisto et al., 1999, *Cancer Res* 59:2944-49) y CA46 (Kreitman et al., 1999, *Int J Cancer* 81:148-55). Un ejemplo 20 no limitante de una línea de linfoma de Hodgkin que expresa CD70 es L540cy (Barth et al., 2000 *Blood* 95:3909-14; Wahl et al., 2002, *Cancer Res* 62:3736-42). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de carcinoma de células renales humanas que expresan CD70 incluyen 786-O (Ananth et al., 1999, *Cancer Res* 59:2210-6; Datta et al., 2001, *Cancer Res* 61:1768-75), ACHN (Hara et al., 2001, *J Urol.* 166:2491-4; Miyake et al., 2002, *J Urol.* 167:2203-8), Caki-1 (Prewett et al., 1998, *Clin. Cancer Res.* 4:2957-66; Shi y Siemann, 2002, *Br. J. Cancer* 87:119-26), y Caki-2 (Zellweger et al., 2001, *Neoplasia* 3:360-7). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de carcinoma 25 nasofaríngeo que expresan CD70 incluyen C15 y C17 (Busson et al., 1988, *Int. J. Cancer* 42:599-606; Bernheim et al., 1993, *Cancer Genet. Cytogenet.* 66:11-5). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de glioma humano que expresan CD70 incluyen U373 (Palma et al., 2000, *Br. J. Cancer* 82:480-7) y U87MG (Johns et al., 2002, *Int. J. Cancer* 98:398-408). Estas líneas de células tumorales se pueden establecer en hospedadores de roedores 30 inmunodeficientes en forma de tumor sólido mediante inyecciones subcutáneas o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez establecidas en el hospedador, estos modelos tumorales se pueden aplicar para determinar las eficacias terapéuticas de los ADCs anti-CD70 o de los derivados de ADC tal como se describe en la presente memoria sobre la modulación del crecimiento tumoral *in vivo*.

VII.Trastornos Inmunológicos y Cánceres que Expresan CD70

40 Los ADCs y los derivados de ADC anti-CD70 tal como se describen en la presente memoria son útiles para tratar o prevenir un trastorno inmunológico caracterizado por la activación inapropiada de células inmunológicas (v.g., linfocitos o células dendríticas). El tratamiento o la prevención del trastorno inmunológico, de acuerdo con los métodos descritos aquí, se consigue administrando a un sujeto que necesita tal tratamiento o prevención una 45 cantidad eficaz del ADC o el derivado de ADC anti-CD70, por lo que el ADC o derivado de ADC (i) se une a células inmunológicas activadas que expresan CD70 y que están asociadas con el estado de enfermedad, y (ii) ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células inmunológicas activadas.

Las enfermedades inmunológicas que se caracterizan por activación inapropiada de células inmunológicas, y que se pueden tratar o prevenir por los métodos descritos aquí pueden clasificarse, por ejemplo, por el o los tipos de 50 reacción o reacciones de hipersensibilidad que son la verdadera causa del trastorno. Estas reacciones se clasifican típicamente en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citofíticas), reacciones por complejos inmunológicos, o reacciones inmunológicas mediadas por células (CMI) (también conocidas como reacciones de hipersensibilidad tardía (DTI)). (Véase, v.g., ., *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3ª ed. 1993).)

Los ejemplos específicos de estas enfermedades inmunológicas incluyen las siguientes: artritis reumatoide, 55 enfermedades desmielinizantes autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomielitís alérgica), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, 60 síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto,

5 enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, el pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, pénfigo, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad mixta del tejido conectivo, poliarteritis nodosa, vasculitis necrotizante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post cardiectomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmune, pulmón de cuidador de aves, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción a la transfusión, la arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behçet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomielititis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmítis, eritema elevatum et diutinum, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrómica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Schonlein Henoch, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenström, síndrome de Evans, e insuficiencia gonadal autoinmune.

20 Por consiguiente, los métodos descritos en esta memoria abarcan el tratamiento de trastornos de los linfocitos B (v.g., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes de tipo I), trastornos de linfocitos Th₁ (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad aguda injerto contra huésped), o trastornos de los linfocitos Th₂ (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica o crónica de injerto contra huésped). Generalmente, los trastornos que implican a las células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th₁ o linfocitos Th₂.

30 En ciertas realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno inmunológico mediado por células T, tal como un trastorno de células T en el que las células T activadas asociadas con el trastorno expresan CD70. Los ADC o derivados de ADC se pueden administrar para eliminar células T activadas que expresan CD70. En una realización específica, la administración de ADC o derivados de ADC puede eliminar células T activadas que expresan CD70, mientras que las células T sin activar son sustancialmente no eliminadas por el ADC o el derivado de ADC. En este contexto, "sustancialmente no eliminadas" significa que menos de aproximadamente 60%, o menos de aproximadamente 70% o menos de aproximadamente 80% de células T no activadas no son eliminadas.

35 Los ADCs y los derivados de ADC anti-CD70 tal como se describen en la presente memoria también son útiles para tratar o prevenir un cáncer que expresa CD70. El tratamiento o la prevención de un cáncer que expresa CD70, según los métodos descritos en la presente memoria, se lleva a cabo administrando a un sujeto que necesita tal tratamiento o prevención una cantidad eficaz del ADC o del derivado de ADC anti-CD70, por lo que el ADC o el derivado de ADC (i) se une a las células cancerosas que expresan CD70 y (ii) ejerce un efecto citotóxico o citostático para eliminar o inhibir la proliferación de las células cancerosas que expresan CD70.

40 Los cánceres que expresan CD70 que se pueden tratar o prevenir mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, diferentes subtipos de linfoma no Hodgkin poco activo (NHLs poco activos) (p.ej., NHLs foliculares, linfomas linfocíticos pequeños, NHLs linfoplasmacíticos, o NHLs de zona marginal) cánceres de la línea de células B, que incluyen, p.ej., el linfoma de Burkitt y la leucemia linfocítica crónica; carcinomas de las células renales; carcinomas nasofaríngeos; carcinomas tímicos; gliomas; meningiomas; y carcinomas de colon, estómago, y recto.

VIII. Composiciones Farmacéuticas que Comprenden ADCs Anti-CD70 y Derivados de ADC y Administración de las Mismas

50 De acuerdo con los presentes métodos, se administra una composición que comprende un ADC o un derivado de ADC anti-CD70 tal como se describe en la presente memoria a un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD70. La expresión "sujeto", tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier paciente mamífero al que se puede administrar un conjugado proteína de unión a CD70-fármaco, que incluye, p.ej., seres humanos y mamíferos no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los sujetos destinados específicamente para el tratamiento mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria incluyen los seres humanos. Los ADCs o los derivados de ADC se pueden administrar solos o en combinación con otras composiciones en la prevención o el tratamiento del trastorno inmunológico o del cáncer que expresa CD70.

60 Se conocen diversos sistemas de administración, y se pueden usar para administrar el ADC o el derivado de ADC anti-CD70. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los ADCs o los derivados de ADC se pueden

administrar, por ejemplo, mediante infusión o mediante inyección rápida, mediante la absorción a través de las membranas epiteliales o mucocutáneas (p.ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, y similares), y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos, tales como agentes quimioterápicos. La administración puede ser sistémica o local.

5 En las realizaciones específicas, la composición de ADC o de derivado de ADC anti-CD70 se administra mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, y el implante es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye una membrana, tal como una membrana de sialastic, o una fibra. Típicamente, cuando se administra la composición, se usan materiales en los que no se absorbe el ADC o el derivado de ADC.

10 En otras realizaciones, el ADC o el derivado de ADC se administra en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release* (Langer & Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen & Ball eds., Wiley, Nueva York, 1984); Ranger y Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. Véase además Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Se discuten otros sistemas de liberación controlada, por ejemplo, en Langer, anteriormente mencionado.

Los ADC o los derivados de ADC anti-CD70 se administran en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del ADC o del derivado de ADC y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica incluye típicamente uno o más vehículos farmacéuticos (p.ej., líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los del petróleo, los de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra de manera intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para las soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Una formulación oral puede incluir vehículos habituales tales como los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico o de la proteína, típicamente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo, para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Las formulaciones se corresponden con el modo de administración.

En las realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son disoluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición farmacéutica puede incluir además un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para mitigar el dolor en el lugar de la inyección. Típicamente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o de un concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobre en el que se indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el ADC o el derivado de ADC anti-CD70 pueden comprender además un segundo agente terapéutico (p.ej., un segundo ADC o derivado de ADC o un agente citotóxico o inmunosupresor sin conjugar tal como, por ejemplo, cualquiera de los descritos en la presente memoria).

Además, se puede proporcionar la composición farmacéutica en forma de un equipo farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un ADC o un derivado de ADC anti-CD70 en forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (p.ej., agua estéril) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable se puede usar para la reconstitución o la dilución del ADC o derivado de ADC liofilizado. Se puede asociar opcionalmente con tal(es) recipiente(s) una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la comercialización de productos farmacéuticos o biológicos, la cual refleja por parte de la agencia la aprobación de la fabricación, el uso o la comercialización para la administración a seres humanos.

La cantidad del ADC o del derivado de ADC que es eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno inmunológico o de un cáncer que expresa CD70 se puede determinar mediante técnicas clínicas habituales. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración y de la fase del

5 cáncer que expresa CD70, y se debería decidir según el juicio del médico que aplica el tratamiento y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta procedentes de sistemas de *ensayo in vitro* o de modelos animales.

Por ejemplo, se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ADCs o de los derivados de ADC en cultivos celulares o en animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos habituales para la

10 determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren los ADCs o los derivados de ADC que exhiben índices terapéuticos elevados. Cuando un ADC o un derivado de ADC exhibe efectos secundarios tóxicos, se puede usar un sistema de administración que dirige el ADC o el derivado de ADC al lugar del tejido afectado para minimizar el daño

15 potencial a las células que no expresan CD70 y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos con cultivos celulares y de los estudios con animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para el uso en seres humanos. La dosificación del ADC o del derivado de ADC anti-CD70 está generalmente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica

20 empleada, y de la vía de administración utilizada. Para cualquier ADC o derivado de ADC usado en el método, se puede estimar la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición del 50% de los síntomas) tal como se determina en el cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar de manera más

25 precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

En general, la dosificación de un ADC anti-CD70 o de un derivado de ADC administrado a un paciente con un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD70 es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal

30 del sujeto. Más típicamente, la dosis administrada a un sujeto es 0,1 mg/kg a 50 mg/kg del peso corporal del sujeto, aún más típicamente 1 mg/kg a 30 mg/kg, 1 mg/kg a 20 mg/kg, 1 mg/kg a 15 mg/kg, o 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunológica hacia las proteínas exógenas. Así, a menudo son posibles las dosis menores de ADCs que comprenden anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos, y la administración menos frecuente.

El ADC o derivado de ADC anti-CD70 se puede administrar en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD70. Por

35 ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un segundo agente citostático, citotóxico o inmunosupresor (por ejemplo, un agente citostático, citotóxico o inmunosupresor sin conjugar tal como los usados de manera convencional para el tratamiento de trastornos inmunológicos o cánceres). La terapia de combinación puede incluir

40 además, p.ej., la administración de un agente que selecciona como objetivo un receptor o complejo de receptores distinto de CD70 en la superficie de los linfocitos activados, las células dendríticas o las células cancerosas que expresan CD70. Un ejemplo de tal agente es un segundo anticuerpo que no es anti-CD70 que se une a una molécula en la superficie de un linfocito activado, célula dendrítica o célula cancerosa que expresan CD70. Otro

45 ejemplo es un ligando que selecciona como objetivo tal receptor o complejo de receptores. Típicamente, tal anticuerpo o ligando se une a un receptor de la superficie celular en los linfocitos activados, las células dendríticas o las células cancerosas que expresan CD70 y aumenta el efecto citotóxico o citostático del anticuerpo anti-CD70 confiriendo una señal citostática o citotóxica a las células cancerosas que expresan CD70.

Tal administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (p.ej., la gravedad de un síntoma, el número de síntomas, o la frecuencia de las recidivas).

Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatoria, en una realización específica, un ADC o un derivado de ADC anti-CD70 se administra de manera concurrente con un segundo agente terapéutico. En

50 otra realización específica, el segundo agente terapéutico se administra antes o después de la administración del ADC o del derivado de ADC anti-CD70, al menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, o tres meses, antes o después de la administración del ADC o del derivado de ADC.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención. Las líneas celulares descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en cultivos según las

60 condiciones especificadas por la American Type Culture Collection (ATCC) o la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ). Los reactivos de los cultivos celulares se obtuvieron de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.

Ejemplo 1: Análisis de la Secuencia de los Anticuerpos Monoclonales Anti-CD70 1F6 y 2F2

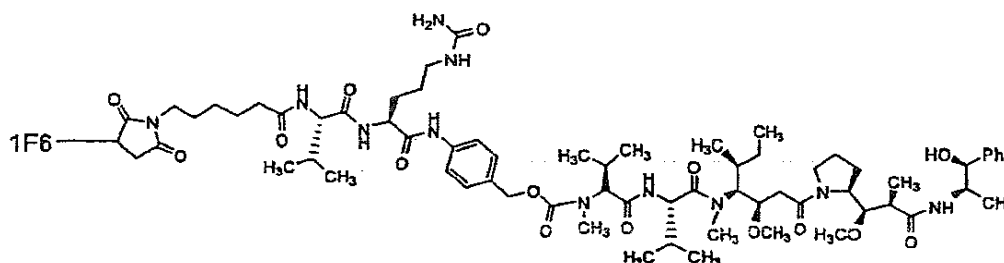
Para determinar las secuencias de cADN que codifican las regiones variables de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) de los mAb 1F6 y 2F2, se aisló el ARN total de hibridomas de 1F6 y 2F2 mediante el uso del reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aplicaron los cebadores específicos de los genes mlgcK1 5'-CTT CCA CTT GAC ATT GAT GTC TTT G-3' (SEQ ID N°:41) y mlgG1 5'-CAG GTC ACT GTC ACT GGC TCA G-3' (SEQ ID N°:42) para transcribir inversamente la primera cadena de los cADNs de la región variable de la cadena ligera (VL) y de la región variable de la cadena pesada (VH) a partir de ambas preparaciones de ARN, respectivamente. Las reacciones de la primera cadena de cADN se llevaron a cabo mediante el uso del sistema de síntesis de la primera cadena para RT-PCR SuperScript™ de Invitrogen (Carlsbad, CA). Después se aplicó una cola de poli-G a los cADNs de VL y VH mediante el uso de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Invitrogen), y el tampón TdT suministrado en las condiciones especificadas por el fabricante. Las primeras cadenas de cADNs de VL y VH con colas de poli-G se sometieron después a amplificación mediante PCR. El cebador directo para las PCRs tanto de VL como de VH fue ANCTAIL 5' GTC GAT GAG CTC TAG AAT TCG TGC CCC CCC CCC CCC C-3' (SEQ ID N°:43). El cebador inverso para la amplificación de VL fue HBS-mck 5'-CGT CAT GTC GAC GGA TCC AAG CTT CAA GAA GCA CAC GAC TGA GGC AC-3' (SEQ ID N°:44). El cebador inverso para la amplificación de VH fue HBS-mG1 5'-CGT CAT GTC GAC GGA TCC AAG CTT GTC ACC ATG GAG TTA GTT TGG GC-3' (SEQ ID N°:45). Las PCRs se llevaron a cabo con Ex Taq (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y el tampón de reacción suministrado en las condiciones especificadas por el fabricante. Los productos de la PCR de VL y VH se cortaron después mediante HindIII y EcoRI y se clonaron en pUC19 cortado con HindIII/EcoRI. Se identificaron los clones con el plásmido recombinante, y se determinaron las secuencias nucleotídicas para los hibridomas de 1F6 y 2F2.

Se determinaron las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en las cadenas pesadas y ligeras de los mAbs 1F6 y 2F2 según los criterios descritos en Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Washington D.C., US Department of Health and Public Services; Chotia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-17 (Figuras 1 y 2). Las alineaciones de secuencias a nivel tanto del cADN como de los aminoácidos revelaron que probablemente se utilizaron genes de la cadena ligera estrechamente relacionados en ambos hibridomas. Existe un 92% de identidad de secuencias entre VL de 1F6 y VL de 2F2 a nivel de aminoácidos. La comparación de secuencias de las CDRs demuestra que la CDR-L1 de 1F6 es idéntica a la CDR-L1 de 2F2, solamente una sustitución divergente está presente entre CDR-L2 de 1F6 y CDR-L2 de 2F2, y solamente 2 sustituciones conservativas están presentes entre CDR-L3 de 1F6 y CDR-L3 de 2F2 (Figura 3). Por otra parte, hay presente un nivel más elevado de diversidad de secuencias entre VH de 1F6 y VH de 2F2, alrededor de 66 de 137 residuos de aminoácidos son diferentes entre las 2 VHs. La comparación de secuencias de las CDRs demuestra que 5 de 10 residuos son diferentes entre CDR-H1 de 1F6 y CDR-H1 de 2F2 (3 de las 5 sustituciones son divergentes), 12 de 17 residuos son diferentes entre CDR-H2 de 1F6 y CDR-H2 de 2F2 (9 de las 12 sustituciones son divergentes), y 5 de 9 residuos son diferentes entre CDR-H3 de 1F6 y CDR-H3 de 2F2 (4 de las 5 sustituciones son divergentes) (Figura 3).

Ejemplo 2: Síntesis de Conjugados Anti-CD70-Fármaco

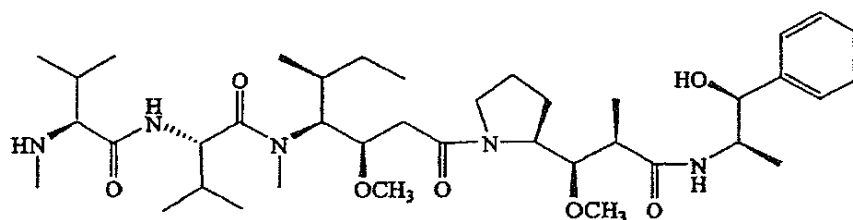
Se analizó la capacidad de anti-CD70 para administrar un fármaco citotóxico potente en forma de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para eliminar las células que expresan CD70. Se usó monometil auristatina E (MMAE), auristatina fenilalanina fenilendiamina (AFP), y monometil auristatina fenilalanina (MMAF) como los fármacos citotóxicos de acción selectiva para este estudio. Los fármacos se unieron al mAb anti-CD70 1F6 mediante el enlazador dipeptídico valina-citrulina (vc) para proporcionar los conjugados 1F6-vcMMAE, 1F6-vcAFP y 1F6-vcMMAF.

A. Síntesis de 1F6-vcMMAE



La síntesis del ADC 1F6-vcMMAE, cuya estructura general se representa arriba, se describe más adelante.

1. Síntesis del Compuesto Fármaco-Enlazador



MMAE

La síntesis de auristatina E se ha descrito previamente (patente de EE.UU. nº 5.635.483; Pettit, 1999, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70:1-79). El derivado de monometilo de Auristatina E (MMAE) se preparó sustituyendo una forma protegida de monometilvalina por N,N-dimetilvalina en la síntesis de la auristatina E (Senter *et al.*, y documento PCT/US03/24209 (anteriormente mencionado)).

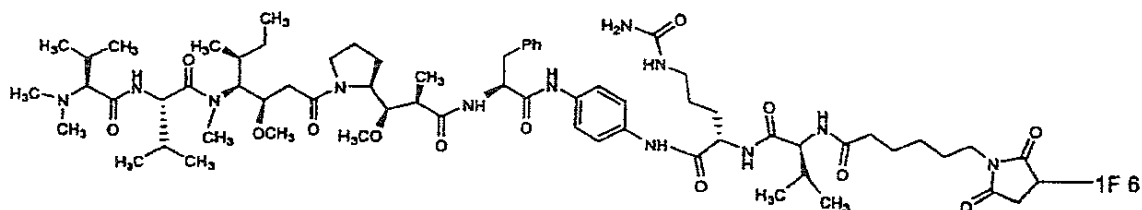
Para preparar el compuesto fármaco-enlazador, se diluyó MMAE (1,69 g, 2,35 mmol), p-nitrofenilcarbonato de alcohol maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-p-aminobencílico (2,6 g, 3,52 mmol, 1,5 eq., preparado tal como se describe en Dubowchik *et al.*, 2002, *Bioconjugate Chem.* 13:855-869) y HOBt (64 mg, 0,45 mmol, 0,2 eq.) con DMF (25 mL). Después de 2 min, se añadió piridina (5 mL) y la reacción se monitorizó mediante el uso de HPLC en fase inversa. Se demostró que la reacción se completó en 24 hr. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite oscuro, que se diluyó con 3 mL de DMF. La disolución de DMF se purificó mediante el uso de cromatografía rápida en columna (gel de sílice, gradiente de eluyente: diclorometano al 100% hasta diclorometano-MeOH 4:1). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un aceite que se solidificó a alto vacío para proporcionar una mezcla del compuesto fármaco-enlazador deseado y MMAE sin reaccionar en forma de un sólido amarillo sucio (R_f 0,40 en diclorometano-MeOH 9:1). El sólido amarillo sucio se diluyó con DMF y se purificó mediante el uso de HPLC preparativa en fase inversa (columna Varian Dynamax C18 de 41,4 mm x 25 cm, 8 μ , 100 Å, mediante el uso de un gradiente de MeCN y TFA acuoso al 0,1% a 45 mL/min desde el 10% al 100% a lo largo de 40 min seguido de un 100% de MeCN durante 20 min) para proporcionar el compuesto fármaco-enlazador deseado en forma de un polvo blanco amorfo (R_f 0,40 en diclorometano-MeOH 9:1) que tuvo una pureza >95% mediante HPLC, y que contuvo menos de un 1% de MMAE. Rendimiento: 1,78 g (57%); ES-MS m/z 1316,7 [M+H]⁺; UV λ_{max} 215, 248 nm.

2. Preparación del Conjugado

Reducción del Anticuerpo. A 0,7 mL de 1F6 (10 mg/mL) se le añadieron 90 μ L de borato sódico 500 mM/NaCl 500 mM, pH 8,0, seguido de 90 μ L de DTT 100 mM en agua, y 20 μ L de H₂O. Tras la incubación a 37 °C durante 30 min, el tampón se intercambió mediante elución en una resina G25 equilibrada y eluida con PBS que contenía DTPA 1 mM (Aldrich). Se halló que el valor tior/Ab era 9,8 determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la disolución, y la concentración de tior mediante la reacción con DTNB (Aldrich) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

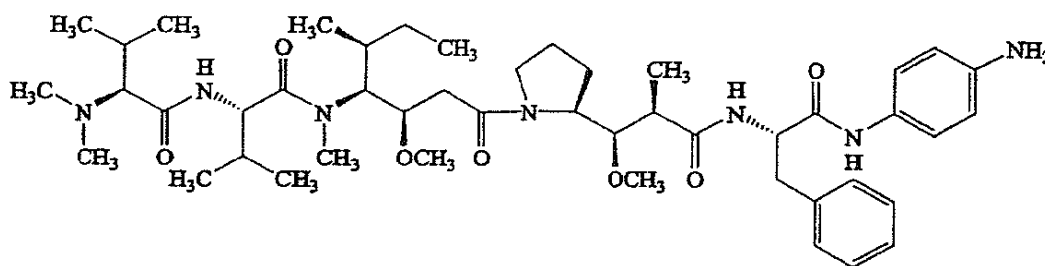
Conjugación del Anticuerpo Reducido. El mAb reducido se enfrió en hielo. El compuesto fármaco-enlazador se usó en forma de una disolución en DMSO de concentración conocida, y se calculó la cantidad de fármaco-enlazador añadida a la mezcla de reacción como sigue: L solución de reserva = $V \times [Ab] \times \text{Proporción en Exceso}/[\text{Fármaco-Enlazador}]$, en la que V y [Ab] son el volumen y la concentración molar de la disolución de anticuerpo reducido, respectivamente. Se añadieron 0,904 μ L de H₂O frío a la disolución de anticuerpo reducido, seguido de 500 μ L de acetonitrilo frío. Se diluyeron 30,5 μ L de disolución de reserva de compuesto fármaco-enlazador 10,2 mM en 1,47 mL de acetonitrilo. La disolución de fármaco-enlazador en acetonitrilo se enfrió en hielo, y después se añadió a la disolución de anticuerpo reducido. La reacción se terminó después de 0,5 hr mediante la adición de un exceso molar de 20 veces de cisteína sobre maleimida. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y se purificó mediante elución a través de G25 de desalación en PBS a 4 °C. Después se filtró el 1F6-vcMMAE a través de filtros de 0,2 micras en condiciones estériles, se congeló inmediatamente a -80 °C. Se analizó el 1F6-vcMMAE en cuanto a 1) la concentración, mediante la absorbancia UV; 2) la agregación, mediante cromatografía de exclusión por tamaños; 3) fármaco/Ab, midiendo los tioles sin reaccionar con DTNB, y 4) el fármaco exento de productos residuales, mediante HPLC en fase inversa.

B. Síntesis de 1F6-vcAFP



La síntesis del ADC 1F6-vcAFP, cuya estructura general se representa arriba, se describe más adelante.

1. Síntesis de AFP:



AFP

5

Se añadió Boc-fenilalanina (1,0 g, 3,8 mmol) a una suspensión de 1,4-diaminobenceno-HCl (3,5 g, 19,0 mmol, 5,0 eq.) en trietilamina (10,7 mL, 76,0 mmol, 20 eq.) y diclorometano (50 mL). A la disolución resultante se le añadió DEPC (3,2 mL, 19,0 mmol, 5,0 eq.) por medio de una jeringa. La HPLC no mostró Boc-phe restante después de 24 hr. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró para proporcionar un sólido oscuro. El residuo sólido oscuro se repartió entre 1:1 EtOAc-agua, y la capa de EtOAc se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La capa de EtOAc se secó y se concentró para proporcionar un residuo/rojo oscuro que se purificó mediante el uso de HPLC (columna Varian Dynamax 41,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å mediante el uso de un gradiente de MeCN y agua a 45 mL/min desde el 10% hasta el 100% durante 40 min, seguido por el 100% de MeCN durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un intermedio sólido rojo-marrón. Rendimiento: 1,4 g (100%); ES-MS m/z 355,9 $[M+H]^+$; UV λ_{max} 215, 265 nm; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 7,48 (1 H, s a), 7,22-7,37 (5 H, m), 7,12 (2 H, d, $J=8,7$ Hz), 7,61 (2 H, d, $J=8,7$ Hz), 5,19 (1 H, s a), 4,39-4,48 (1 H, m), 3,49 (2 H, s), 3,13 (2 H, d, $J=5,7$ Hz), 1,43 (9 H, s).

Se diluyó el intermedio sólido rojo-marrón (0,5 g, 1,41 mmol) y diisopropiletilamina (0,37 mL, 2,11 mmol, 1,5 eq.) con diclorometano (10 mL), y a la disolución resultante se le añadió Fmoc-Cl (0,38 g, 1,41 mmol). La reacción se dejó con agitación, y se formó un precipitado sólido blanco después de unos cuantos minutos. La reacción se completó según la HPLC después de 1 hr. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró para proporcionar un aceite. El aceite se precipitó con EtOAc, lo que dio como resultado un producto intermedio blanco-rojizo, que se recogió mediante filtración y se secó a vacío. Rendimiento: 0,75 g (93%); ES-MS m/z 578,1 $[M+H]^+$, 595,6 $[M+NH_4]^+$.

El intermedio blanco-rojizo (0,49 g, 0,85 mmol), se diluyó con 10 mL de diclorometano, y después se trató con 5 mL de ácido trifluoroacético. La reacción se completó en 30 min según la HPLC en fase inversa. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo resultante se precipitó con éter para proporcionar un sólido blanquecino. El sólido blanquecino se filtró y se secó para proporcionar un polvo amorfo, que se añadió a una disolución de Boc-Dolaprina (preparada tal como se describe en *Tetrahedron*, 1993, 49(9):1913-1924) (0,24 g, 0,85 mmol) en diclorometano (10 mL). A esta disolución se le añadió trietilamina (0,36 mL, 2,5 mmol, 3,0 eq.) y PyBrop (0,59 g, 1,3 mmol, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se monitorizó mediante el uso de HPLC en fase inversa. Tras la finalización, la mezcla de reacción se concentró, y el residuo resultante se diluyó con EtOAc, y se lavó secuencialmente con ácido cítrico acuoso al 10%, agua, bicarbonato sódico acuoso saturado, agua, y salmuera. La capa de EtOAc se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante el uso de cromatografía rápida en columna (gel de sílice) para proporcionar un intermedio en polvo blanquecino. Rendimiento: 0,57 g (88%); ES-MS m/z 764,7 $[M+NH_4]^+$; UV λ_{max} 215, 265 nm; 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 10,0-10,15 (1 H, m), 9,63 (1 H, s a), 8,42 (1/2 H, d, $J=8,4$ Hz), 8,22 (1/2 H, d, $J=8,4$ Hz), 7,89 (2 H, d, $J=7,2$ Hz), 7,73 (2 H, d, $J=7,6$ Hz), 7,11-7,55 (13 H, m), 4,69-4,75 (1 H, m), 4,46 (2 H, d, $J=6,8$ Hz), 4,29 (1 H, t, $J=6,4$ Hz), 3,29 (3 H, s), 2,77-3,47 (7 H, m), 2,48-2,50 (3 H, m), 2,25 (2/3 H, dd, $J=9,6, 7,2$ Hz), 1,41-1,96 (4 H, m), 1,36 (9 H, s), 1,07 (1 H, d, $J=6,4$ Hz, isómero rotacional), 1,00 (1 H, d, $J=6,4$ Hz, isómero rotacional).

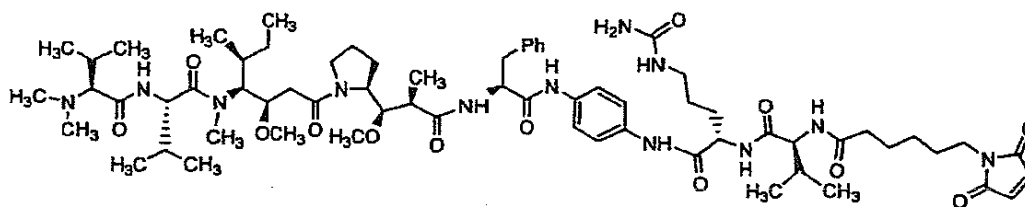
35

Se diluyó el intermedio sólido blanco (85 mg, 0,11 mmol) y N-Metilval-val-dil-O-*t*-butilo (55 mg, 0,11 mmol, preparado como se describe en Pettit *et al.* 1996, *J. Chem. Soc. Perk. I* pág. 859) con diclorometano (5 mL), y después se trató con 2,5 mL de ácido trifluoroacético en una atmósfera de nitrógeno durante dos horas a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se confirmó mediante RP-HPLC. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo resultante se secó azeotrópicamente dos veces con tolueno, y después se secó a alto vacío durante 12 horas.

El residuo se diluyó con diclorometano (2 mL), se añadió diisopropiletilamina (3 eq.), seguido de DEPC (1,2 eq.). Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, el residuo resultante se diluyó con EtOAc, y se lavó secuencialmente con ácido cítrico acuoso al 10%, agua, bicarbonato sódico acuoso saturado, y salmuera. La capa de EtOAc se secó, se filtró y se concentró para proporcionar un aceite amarillo.

El aceite amarillo se diluyó con diclorometano (10 mL) y se añadió dietilamina (5 mL) a la disolución resultante. Según la HPLC, la reacción se completó después de 2 hr. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite. El aceite se diluyó con DMSO, y la disolución de DMSO se purificó mediante el uso de HPLC preparativa en fase inversa (columna Varian Dynamax de 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, mediante el uso de un gradiente de MeCN y TFA al 0,1% a 20 mL/min desde el 10% hasta el 100% a lo largo de 40 min, seguido del 100% de MeCN durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el fármaco deseado en forma de un sólido blanquecino. Rendimiento total: 42 mg (44% en total); ES-MS m/z 837,8 [M+H]⁺, 858,5 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215, 248 nm.

2. Preparación del Compuesto Fármaco-Enlazador



Se diluyó la sal de trifluoroacetato de AFP (0,37 g, 0,39 mmol, 1,0 eq.) y Fmoc-val-cit (0,30 g, 0,58 mmol, 1,5 eq., preparado según Dubowchik *et al.*, 2002, *Bioconjugate Chem.* 13:855-896) con DMF (5 mL, 0,1 M), y a la disolución resultante se le añadió piridina (95 μ L, 1,2 mmol, 3,0 eq.). Después se añadió HATU (0,23 g, 0,58 mmol, 1,5 eq.) en forma de un sólido, y la mezcla de reacción se dejó con agitación en una atmósfera de argón mientras se monitorizaba mediante el uso de HPLC. La reacción progresó lentamente, y 4 hr más tarde se añadió 1,0 eq. de diisopropiletilamina. La reacción se completó en 1 hr. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo resultante se purificó mediante el uso de prep-HPLC (columna Varian Dynamax C18 de 41,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, mediante el uso de un gradiente de MeCN y TFA acuoso al 0,1% a 45 mL/min desde el 10% hasta el 100% a lo largo de 40 min, seguido del 100% de MeCN durante 20 min) para proporcionar un intermedio sólido rosado pálido.

El intermedio sólido rosado se diluyó con DMF (30 mL) y a la disolución resultante se le añadió dietilamina (15 mL). La reacción se completó mediante HPLC en 2 hr. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se lavó dos veces con éter. El intermedio sólido se secó a alto vacío y se usó después directamente en la siguiente etapa.

El intermedio sólido se diluyó con DMF (20 mL) y a la disolución resultante se le añadió éster 2,5-dioxi-pirrolidin-1-ílico del ácido 6-(2,5-dioxi-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-hexanoico (0,12 g, 0,39 mmol, 1,0 eq.) (EMCS, Molecular Biosciences Inc., Boulder, CO). Después de 4 días, la mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite que se purificó mediante el uso de prep-HPLC (columna Varian Dynamax C18 de 41,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, mediante el uso de un gradiente de MeCN y TFA acuoso al 0,1% a 45 mL/min desde el 10% hasta el 100% a lo largo de 40 min, seguido del 100% de MeCN durante 20 min) para proporcionar el compuesto fármaco-enlazador deseado en forma de un sólido blanco escamoso. Rendimiento: 0,21 g (38% en total); ES-MS m/z 1285,9 [M+H]⁺; 13.07.8 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215, 266 nm.

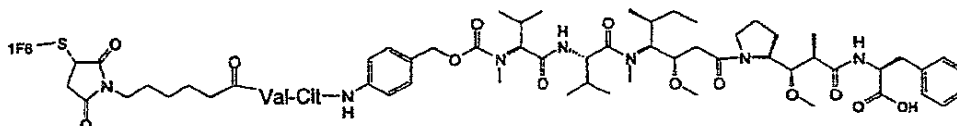
3. Preparación del Conjugado

Reducción del Anticuerpo. A 0,48 mL de 1F6 (10,4 mg/mL) se le añadieron 75 mL de borato sódico 500 mM/NaCl 500 mM, pH 8,0, seguido de 75 μ L de DTT 100 mM en agua, y 20 μ L de PBS. Tras la incubación a 37 °C durante 30 min, el tampón se intercambiaba mediante elución en una resina G25 equilibrada y eluida con PBS que contenía DTPA 1 mM (Aldrich). Se halló que el valor tior/Ab era 10,3 determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la disolución, y la concentración de tior mediante la reacción con DTNB (Aldrich) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Conjugación del Anticuerpo Reducido. El mAb reducido se enfrió en hielo. El compuesto fármaco-enlazador se usó en forma de una disolución de DMSO de concentración conocida, y la cantidad de fármaco-enlazador añadida a la mezcla de reacción se calculó como sigue: L disolución de reserva = V x [Ab] x Proporción en Exceso/[Fármaco-Enlazador], en la que V y [Ab] son el volumen y la concentración molar de la disolución de anticuerpo reducido,

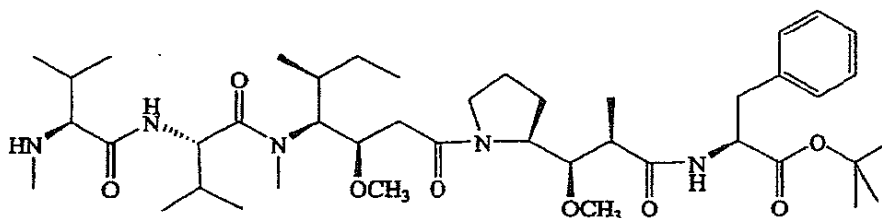
respectivamente. Se añadieron 984 μL de PBS/DTPA frío a la disolución de anticuerpo reducido, seguido de 400 μL de acetonitrilo, y la mezcla se enfrió en hielo. Después se añadieron 26,4 μL de disolución de reserva de compuesto fármaco-enlazador 8,3 mM a la disolución de anticuerpo reducido/DMSO. La reacción se terminó después de 1 hr mediante la adición de 40 μL de cisteína 100 mM. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y se purificó mediante elución a través de una columna G25 de desalación en PBS a 4 $^{\circ}\text{C}$. El 1F6-vcAFP se filtró después a través de filtros de 0,2 micras en condiciones estériles, y se congeló inmediatamente a -80 $^{\circ}\text{C}$. El 1F6-vcAFP se analizó en cuanto a 1) la concentración, mediante absorbancia UV; 2) la agregación, mediante cromatografía de exclusión por tamaños; 3) fármaco/Ab, midiendo los toiles sin reaccionar mediante tratamiento con DTT, seguido de DTNB, y 4) el fármaco libre residual, mediante HPLC en fase inversa.

10 C. Síntesis de 1F6-vcMMAF



La síntesis del ADC 1F6-vcMMAF, cuya estructura general se representa arriba, se describe a continuación.

1. Síntesis de MMAF



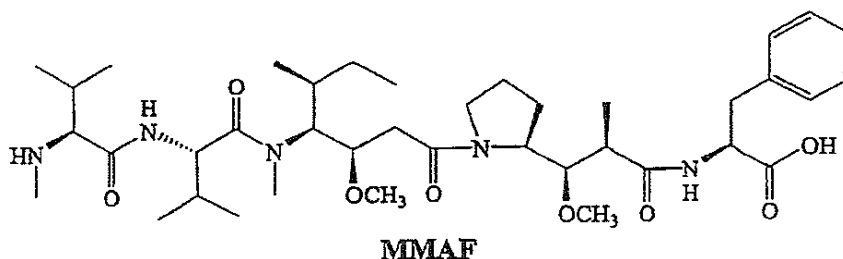
15 Compuesto 1

Se preparó MMAF a partir de su éster *t*-butílico (Compuesto 1) tal como se describe más adelante. Se diluyó la sal de HCl del éster *t*-butílico de fenilalanina (868 mg, 3 mmol), N-Boc-Dolaproína (668 mg, 1 eq.), DEPC (820 μL , 1,5 eq.), y DIEA (1,2 mL) con diclorometano (3 mL). Después de 2 horas (h) a temperatura ambiente (alrededor de 28 $^{\circ}\text{C}$), la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 mL), se lavó sucesivamente con NaHCO_3 acuoso (ac.) saturado (2 x 10 mL), NaCl ac. saturado (2 x 10 mL). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice con acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el dipéptido en forma de un sólido blanco: 684 mg (46%). ES-MS m/z 491,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Para la escisión de Boc selectiva en presencia del éster *t*-butílico, el dipéptido anterior (500 mg, 1,28 mmol) se diluyó con dioxano (2 mL). Se añadió HCl 4 M/dioxano (960 μL , 3 eq.), y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se observó la desprotección de Boc prácticamente completa mediante RP-HPLC con una cantidad mínima de escisión del éster *t*-butílico. La mezcla se enfrió en un baño de hielo, y se añadió trietilamina (500 μL). Después de 10 min, la mezcla se extrajo del baño de hielo, se diluyó con diclorometano (20 mL), se lavó sucesivamente con NaHCO_3 ac. saturado (2 x 10 mL), NaCl ac. saturado (2 x 10 mL). La capa orgánica se concentró para proporcionar una espuma amarilla: 287 mg (57%). El intermedio se usó sin purificación adicional.

El tripéptido *N*-Fmoc-*N*-Metilval-val-dil-*O*-*t*-butilo (0,73 mmol) se trató con TFA (3 mL), diclorometano (3 mL) durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró hasta sequedad, el residuo se co-evaporó con tolueno (3 x 20 mL), y se seco a vacío durante la noche. El residuo se diluyó con diclorometano (5 mL) y se añadió al dipéptido desprotegido Dap-phe-*O*-*t*-butilo (287 mg, 0,73 mmol), seguido de DIEA (550 μL , 4 eq.), DEPC (201 μL , 1,1 eq.). Después de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 mL), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10% (2 x 20 mL), NaHCO_3 ac. saturado (2 x 10 mL), NaCl ac. saturado (10 mL). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó por medio de cromatografía rápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar *N*-Fmoc-*N*-Metilval-val-dil-dap-phe-*O*-*t*-butilo en forma de un sólido blanco: 533 mg (71%). R_f 0,4 (EtOAc). ES-MS m/z 1010,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

El producto (200 mg, 0,2 mmol) se diluyó con diclorometano (3 mL), dietilamina (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron para proporcionar un aceite que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice en un gradiente por etapas 0-10% de MeOH en diclorometano para proporcionar el Compuesto 1 en forma de un sólido blanco: 137 mg (87%). R_f 0,3 (10% de MeOH/ CH_2Cl_2). ES-MS m/z 788,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Se preparó MMAF a partir del Compuesto 1 (30 mg, 0,038 mmol) mediante tratamiento con HCl 4 M/dioxano (4 ml) durante 7 h a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente, y el residuo se secó a vacío durante la noche para proporcionar MMAF en forma de un sólido blanco higroscópico: 35 mg (120% calculado para la sal de HCl). ES-MS m/z 732,56 $[M+H]^+$.

2.Preparación del Compuesto Fármaco-Enlazador

Se suspendió el Compuesto 1 (83 mg, 0,11 mmol), *p*-nitrofenilcarbonato de alcohol maleimidocaproil-L-valin-L-citrulin-*p*-aminobencílico (85 mg, 0,12 mmol, 1,1 eq.), y HOBt (2,8 mg, 21 μ mol, 0,2 eq.) en DMF seco (1,5 mL) y piridina (0,3 mL) en una atmósfera de argón. Después de 30 h, se determinó mediante HPLC que la reacción se había completado prácticamente. La mezcla se evaporó, se suspendió en una cantidad mínima de DMSO y se purificó mediante prep-HPLC (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía un 0,1% de TFA) del 10 al 100% en 40 min seguido de 20 min al 100%, a un caudal de 25 mL/min) para proporcionar éster de MC-Val-Cit-PAB-MMAF-O-*t*-butilo en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 103 mg (71%). ES-MS m/z 1387,06 $[M+H]^+$, 1409,04 $[M+Na]^+$; UV λ_{max} 205, 248 nm.

El éster de MC-Val-Cit-PAB-MMAF-O-*t*-butilo (45 mg, 32 μ mol) se suspendió en cloruro de metileno (6 mL) seguido por la adición de TFA (3 mL). La disolución resultante se dejó en reposo durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se purificó mediante prep-HPLC (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía un 0,1% de TFA) del 10 al 100% en 40 min seguido de 20 min al 100%, a un caudal de 25 mL/min). Las fracciones deseadas se concentraron para proporcionar MC-Val-Cit-PAB-MMAF en forma de un sólido blanquecino. Rendimiento: 11 mg (25%). ES-MS m/z 1330,29 $[M+H]^+$, 1352,24 $[M+Na]^+$; UV λ_{max} 205, 248 nm.

3.Preparación del Conjugado

Reducción del Anticuerpo. A 0,75 mL de 1F6 (4,2 mg/mL) se le añadieron 50 μ L de borato sódico 500 mM/NaCl 500 mM, pH 8,0, seguido de 100 μ L de DTT 100 mM en agua, y 100 μ L de PBS. Tras la incubación a 37 °C durante 30 min, el tampón se intercambiò mediante elución en una resina G25 equilibrada y eluida con PBS que contenía DTPA 1 mM (Aldrich). Se halló que el valor tior/Ab era 8,9 determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la disolución, y la concentración de tior mediante la reacción con DTNB (Aldrich) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Conjugación del Anticuerpo Reducido. El mAb reducido se enfrió en hielo. El compuesto fármaco-enlazador se usó en forma de una disolución en DMSO de concentración conocida, y la cantidad de fármaco-enlazador añadida a la mezcla de reacción se calculó como sigue: L disolución de reserva = $V \times [Ab] \times \text{Proporción en Exceso}/[\text{Fármaco-Enlazador}]$, en la que V y [Ab] son el volumen y la concentración molar de la disolución de anticuerpo reducido, respectivamente. El anticuerpo reducido (785 μ L de 1,77 mg/ml) se añadió a la mezcla de 7,2 μ L de MCvcMMAF 12,9 mM en 92 μ L de acetonitrilo y se mezcló rápidamente. La mezcla de reacción se dejó incubar en hielo durante 1 h y fue seguida por la adición de 40 μ L de cisteína 100 mM. La mezcla de reacción se purificó mediante una columna G25 equilibrada en PBS a 4 °C. 1F6-vcAFP se filtró después a través de filtros de 0,2 micras en condiciones estériles y se congeló inmediatamente a -80 °C. 1F6-vcMMAF se analizó en cuanto a 1) la concentración, mediante la absorbancia UV; 2) la agregación, mediante cromatografía de exclusión por tamaños; 3) fármaco/Ab, midiendo los tiores sin reaccionar mediante tratamiento con DTT, seguido por DTNB, y 4) el fármaco libre residual, mediante HPLC en fase inversa.

40 Ejemplo 3: Expresión de CD70 en Líneas Celulares Hematológicas

Se examinó la expresión superficial de CD70 mediante el uso de citometría de flujo. En general, se incubaron 0,2 x 10⁶ células con 50 μ L de medio de tinción (RPMI-1640 complementado con un 5-10% de FBS) que contenía un mAb conjugado con un fluorocromo (10 μ g/ml) para la citometría de flujo de un solo color, o una mezcla de mAbs conjugados con fluorocromos para la citometría de flujo de múltiples colores. Las incubaciones se llevaron a cabo en hielo durante 20-30 minutos. Las células se lavaron después 3 veces con tampón de tinción y se fijaron en PBS que contenía un 1% de paraformaldehído. Se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo con un FACScan (BD Immunocytometry, San Jose, CA) y los datos se analizaron mediante el soporte informático CellQuest (BD Immunocytometry) o WinMDI. Los anticuerpos monoclonales anti-CD70 humano (mAb) 1F6 y 2F2 se obtuvieron del Laboratorio Central del Servicio de Transfusiones de Sangre de la Cruz Roja de los Países Bajos (Ámsterdam,

Países Bajos). 1F6 se conjugó con AlexaFluor488 (AF) (Molecular Probes, Eugene, OR) según las instrucciones del fabricante, y el 1F6 conjugado con AF se usó para detectar CD70 mediante citometría de flujo cuando fue necesario. El mAb anti-CD70 Ki-24 y el mAb anti-CD3 se adquirieron de BD PharMingen (San Diego, CA).

5 Se estudió la expresión del CD70 en la superficie celular en un panel de líneas celulares hematológicas. Este panel incluyó tanto líneas de linfoma de Burkitt (BL) americano negativo para el virus de Epstein-Barr (EBV) como líneas de linfoma de Burkitt africano EBV⁺, una variedad de líneas de linfoma no Hodgkin (NHL) que son EBV⁻, 2 líneas de la enfermedad de Hodgkin (HD), 2 líneas de células linfoblastoides B transformadas con EBV (EBV-LCL), y una línea de leucemia de células T aguda Jurkat (Figura 4). Las líneas celulares se mantuvieron en las condiciones de cultivo especificadas por la ATCC o la DSMZ. Para el análisis mediante citometría de flujo, se usó un anti-CD70 conjugado con AF o disponible comercialmente (clon Ki-24) adquirido de BD PharMingen. Las líneas celulares en las cuales el anti-CD70 mostró una unión mayor del doble en comparación con la unión de IgG de control, basándose en las intensidades medias de fluorescencia, se definieron de manera arbitraria como líneas celulares que expresan CD70. Basándose en este criterio, todas las líneas BL examinadas, tanto EBV⁺ como EBV⁻, expresaron niveles detectables, aunque bajos, de CD70. Cinco de diez líneas celulares de NHL expresaron CD70. Tanto HD como EBV-LCL expresaron además CD70 a niveles que fueron mayores en general que los de las líneas de BL y NHL. Se descubrió que la línea de leucemia de células T Jurkat era CD70⁻.

Ejemplo 4: Efecto Inhibidor de la Proliferación y Citotóxico de los ADCs Anti-CD70 sobre las Líneas Hematológicas CD70⁺

20 Se analizó en un subgrupo de las líneas hematológicas CD70⁺ enumeradas en la Figura 4 la sensibilidad hacia los ADCs de 1F6. Estas líneas se sembraron a 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos por cuadruplicado en un total de 200 µl de medio de cultivo que contenía dosis graduadas de los ADCs tal como se indica en la Figura 5. Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo durante 96 horas. Se usó la incorporación de timidina tritiada (³H-TdR) durante las últimas 16 horas de incubación para determinar la síntesis de ADN. Las respuestas de una línea de linfoma de células B CD70⁺ WSU-NHL y de las células Jurkat CD70⁻ se muestra en los paneles superiores de la Figura 5. Tanto 1F6-vcMMAE como 1F6-vcAFP ejercieron efectos inhibidores dependientes de la dosis sobre la proliferación de las células WSU-NHL. Los efectos inhibidores de la proliferación fueron evidentes cuando se usaron los ADCs a concentraciones mayores de 0,005 µg/ml. Los ADCs de control de IgG sin unión no ejercieron ningún efecto significativo a concentraciones menores de 0,5 µg/ml. Por otra parte, la proliferación de la línea de leucemia aguda de células T Jurkat CD70⁻ no se vio afectada por 1F6-vcMMAE o por 1F6-vcAFP a concentraciones de hasta 2 µg/ml. Por lo tanto, la actividad inhibidora de la proliferación de los ADCs de 1F6 sobre las células positivas seleccionadas como objetivo resultó de la unión específica de los ADCs al CD70 expresado en las células seleccionadas como objetivo. Las respuestas de otras líneas celulares CD70⁺ analizadas se resumen en el panel inferior de la Figura 5. Se observó una inhibición significativa de la proliferación mediante los ADCs de 1F6 en 2 de las 3 líneas de células de linfoma no Hodgkin del linaje B (MC116 y WSU-NHL), 2 de 2 líneas de la enfermedad de Hodgkin, y la línea de células linfoblastoides B transformadas con EBV CESS. En todas las líneas celulares sensibles analizadas, se demostró que 1F6-vcAFP ejercía una actividad inhibidora más potente que 1F6-vcMMAE. Estos resultados indican que los ADCs anti-CD70 se pueden aplicar potencialmente en la inmunoterapia de los linfomas CD70⁺. Además, los EBV-LCLs son muy similares fenotípicamente a las células B normales activadas. Tanto los EBV-LCLs como las células B normales activadas son además células presentadoras de antígenos eficaces que poseen actividades estimuladoras potentes para las células T. La observación de que el ADC anti-CD70 puede inhibir de manera eficaz la proliferación de las células EBV-LCL CESS indica que los ADCs anti-CD70 se pueden aplicar además para inhibir las respuestas inmunológicas eliminando las células B activadas.

Ejemplo 5: Expresión de Transcritos de CD70 en Tumores Sólidos

45 La enfermedad de Hodgkin (HD) y el carcinoma nasofaríngeo (NPC) son dos ejemplos de enfermedades que están asociadas con frecuencia al EBV, y a un estroma linfoide prominente en las localizaciones de los tumores. El papel de este estroma linfoide es incierto, y puede representar la infiltración de linfocitos en los tumores como parte de la respuesta inmunológica hacia los antígenos asociados al tumor. De manera alternativa, el reclutamiento de los linfocitos por las células tumorales puede ser un mecanismo por medio del cual las células tumorales derivan citocinas y factores de crecimiento de los linfocitos infiltrantes de una manera paracrina. Algunos de estos factores de crecimiento pueden contribuir al desarrollo del tumor manteniendo la proliferación de las células tumorales, tal como se ha planteado para la HD (Gruss *et al.*, 1997, *Immunol. Today* 18:156-63). Se ha descubierto que CD70 está presente en las células de Reed-Sternberg en la HD, y la Figura 6 demuestra la expresión de CD70 en las líneas celulares de HD. En un estudio con biopsias tumorales congeladas de carcinomas nasofaríngeos indiferenciados asociados con EBV, el 80% (16 de 20 casos) mostró la expresión *in situ* de la proteína CD70 en las células tumorales (Agathangelou *et al.*, 1995, *Am. J. Pathol.* 147:1152-60). Otros han informado también de la expresión de CD70 en tumores de EBV que incluyen los carcinomas tímicos (Hishima *et al.*, 2000, *Am. J. Surg. Path.* 24:742-746), gliomas, y meningiomas (Held-Feindt y Mentlein, 2002, *Int. J. Cancer* 98:352-56).

60 La expresión potencial de CD70 en tipos de carcinomas adicionales se estudió mediante el uso de la matriz de caracterización de cánceres (CPA) (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). El CPA incluye cADN normalizado de 241 tumores, y los tejidos normales correspondientes de los pacientes individuales. Para examinar la expresión del mensaje de CD70 en estos pacientes, se amplificó un fragmento de cADN que correspondía a la región sin traducir

de 3' de los nucleótidos 734-874 del mensaje de CD70 mediante el uso de la aproximación de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Se sintetizó el cADN de la primera cadena a partir del ARN total aislado de la línea de células de linfoma de Burkitt Ramos (ATCC) mediante el uso del sistema de síntesis de la primera cadena para RT-PCR SuperScript™ de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se usó el cebador directo 5'-CCA CTG CTG CTG ATT AG-3' (SEQ ID N°:46), el cebador inverso 5'-CAA TGC CTT CTC TTG TCC-3' (SEQ ID N°:47), y el equipo Advantage 2 PCR Kit (Clontech, Palo Alto, CA) para la PCR. El producto de la PCR se clonó en el vector pCR4-TOPO y se verificó la secuencia. Para generar una sonda para la hibridación, se llevó a cabo la PCR con el uso del cADN clonado como molde, el par de cebadores anteriores, y el equipo Advantage 2 PCR Kit (Clontech). Para marcar la sonda con ³²P-dGTP, se combinaron 200 ng del producto purificado de la PCR con 75 ng de un hexámero aleatorio, 33 μM de cada uno de dATP, dTTP y dCTP, 5 μl de α-³²P-dGTP (aproximadamente 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 1 μl del fragmento Klenow (New England Biolabs, Beverly, MA), y tampón EcoPol 1X (New England Biolabs) en un volumen total de 50 μl. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se añadió EDTA hasta una concentración final de 10 mM para detener la reacción. La sonda marcada se purificó mediante el uso de microcolumnas ProbeQuant G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Esta sonda se hibridó con el cADN del paciente colocado sobre un CPA mediante el uso de la disolución de hibridación BD ExpressHyb (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron las señales de hibridación mediante formación de imágenes fosforescentes en un Fosfolmager SI (Amersham). La reaplicación de la sonda en el mismo CPA para el gen constitutivo EF-1 dio una proporción tumor:normal de aproximadamente uno por cada par de muestras, lo que confirma una carga comparable de cADN. Por lo tanto, las proporciones entre las señales de hibridación de CD70 obtenidas de los cADNs tumorales y normales se usaron como una medida semi-cuantitativa de la expresión del transcrito de CD70.

Se observó la hibridación diferencial de la sonda de CD70 a un cADN de tumor en varios tipos de cáncer. De manera muy notable, los cADNs de 9 de 20 casos de carcinoma de riñón y un caso de carcinoma de colon, de estómago, y de recto mostraron señales de hibridación más intensas que los cADNs de los tejidos normales correspondientes. Los 9 casos (45%) de cáncer de riñón de la Figura 6, todos clasificados como RCC, mostraron una sobreexpresión mayor del doble (intervalo de 2,3 a 8,9) de los transcritos de CD70. En el único caso de cáncer de estómago, colon, y recto que mostró una hibridación al cADN de CD70 diferencial (Figura 6), las proporciones tumor:normal fueron de 2,9, 8,9, y 3,2, respectivamente.

Se usó una PCR cuantitativa (QPCR) para cuantificar la expresión del transcrito de CD70 en 8 muestras de cADN de RCC y 4 muestras de cADN de riñón normal, todas obtenidas de BioChain (Hayward, CA). Las muestras de cADN de RCC fueron de donantes independientes de los de la CPA de la Figura 6. El análisis mediante QPCR se llevó a cabo con el uso del procedimiento químico de TaqMan™ MGB (Applied Biosystems, Foster City, CA) que contiene un colorante indicador en el extremo 5' (FAM o VIC) y un apagador no fluorescente (NFQ) en el extremo 3' de un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Se usaron ensayos específicos para CD70 (ensayo de Applied Biosystems n° Hs00174297_m1) o un gen de control GAPDH (Applied Biosystems PDAR# 4326317E) para estudiar las muestras. La comparación de la expresión del transcrito de CD70 entre el riñón normal y los tejidos de RCC se llevó a cabo basándose en el método de ciclo umbral (Ct) comparativo tal como se ha informado previamente (Winer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270: 41-49; Aarskog y Vedeler, 2000, *Hum. Genet.* 107: 494-498). Se generaron los valores de Ct para el CD70 y para un gen constitutivo GAPDH a partir de dos reacciones independientes. Los valores de Ct para los transcritos de GAPDH de muestras de riñón normal y de muestras de RCC no difirieron significativamente entre sí (<1 ciclo, prueba t de Student: p=0,405), lo que sugiere que la expresión de CD70 se puede normalizar respecto de GAPDH para la comparación tumor:normal. Los valores de ΔCt para la expresión de CD70 en muestras de RCC y en muestras de riñón normales se calcularon restando Ct_{GAPDH} de Ct_{CD70} para dar ΔCt_{Tumor} y ΔCt_{Normal}, respectivamente. Los valores de ΔΔCt se calcularon restando ΔCt_{Normal} de ΔCt_{Tumor}. Después se expresó la expresión del transcrito de CD70 en RCC como la proporción de incremento respecto de los riñones normales como 2^{Δ(-ΔΔCt)}. Se observó la sobreexpresión del transcrito de CD70 (>2 veces) en 6 de las 8 muestras de cADN de RCC, de manera coherente con los resultados obtenidos a partir del experimento de CPA (Figura 6). La sobreexpresión de los transcritos de CD70 osciló de 2,5 a 133,7 veces (Figura 7).

Ejemplo 6: Expresión de la Proteína CD70 en el Carcinoma de Células Renales

Se usó la inmunohistoquímica para determinar si la sobreexpresión del transcrito de CD70 en RCC fue paralela a la expresión de la proteína CD70. Se fijaron cortes de tejidos de RCC congelados y cortes de tejidos adyacentes normales de dos pacientes independientes de los utilizados en el análisis de los transcritos de CD70 (Figuras 6 y 7) en acetona a -20 °C durante 10 minutos. Tras la rehidratación en PBS, los cortes se bloquearon con PBS que contenía un 5% de suero de cabra normal y Avidina D durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con PBS. Los cortes se incubaron con el mA b anti-CD70 2F2 o con una IgG sin unión a 2 μg/ml en PBS que contenía un 5% de suero de cabra normal con biotina durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de los lavados con PBS, se usó un anti-IgG de ratón biotinilado (equipo VECTASTAIN ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) a una dilución 1:250 en PBS que contenía un 5% de suero de cabra normal para detectar el anticuerpo primario unido mediante incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de anti-IgG de ratón biotinilado se eliminó mediante lavados con PBS. Los cortes se apagaron con un 1% de H₂O₂ en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, y después se incubaron con el complejo VECTASTAIN ABC reconstituido según las instrucciones del fabricante. Después de los lavados con PBS, los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con la disolución DAB (equipo VECTASTAIN ABC) reconstituida según las instrucciones del

fabricante para el desarrollo del color. Los cortes se lavaron después con agua, se llevó a cabo una tinción de contraste con hematoxilina durante 2 minutos, se montó en VectaMount (Vector Laboratories), y después se observó mediante el uso de microscopia óptica 40X.

Se observó una unión intensa de 2F2 a los cortes de los tumores RCC de 2 donantes diferentes (Figura 8A, paneles de la derecha). En contraste, una IgG de control no se unió a los cortes de los tumores en serie, lo que confirmó la especificidad de 2F2 por CD70 (Figura 8A, paneles de la izquierda). 2F2 tampoco demostró unión más allá de la unión de la IgG de control a los tejidos adyacentes normales de las mismas muestras de RCC (Figura 8B), lo que sugiere una expresión mínima o inexistente de la proteína CD70 en los riñones normales. Estos resultados confirman la sobreexpresión de los transcritos de CD70 en RCC y proporcionan pruebas directas de la expresión de la proteína CD70 *in situ* en RCC.

A continuación se examinó la expresión de la proteína CD70 en la superficie de las células de RCC. Se estudió un panel de 7 líneas de RCC mediante el uso de citometría de flujo. Las líneas RCC Hs 835.T, Caki-1, Caki-2, 786-O, 769-P, y ACHN se obtuvieron de la ATCC (Manassas, VA) y se mantuvieron en las condiciones especificadas por la ATCC. Las líneas de RCC CAL54 y A498 se obtuvieron de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania). Las líneas celulares se mantuvieron en las condiciones especificadas por los vendedores. Las líneas de RCC SK-RC-6 y SK-RC-7 se han informado previamente (Murakami *et al.*, 1984, *Hepatology* 42:192-8). SK-RC-6 y SK-RC-7 se mantuvieron en DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS). También se incluyeron en el análisis dos líneas epiteliales de los túbulos renales humanos normales, RPTEC y HRCE (Cambrex, East Rutherford, NJ). La Figura 9A demuestra que las líneas de RCC 786-O, Caki-1, y Caki-2 expresaron CD70, mientras Hs 835.T no lo hizo. También se observaron niveles bajos, pero detectables, de expresión de CD70 en las líneas epiteliales tubulares de riñón normal RPTEC y HRCE. La Figura 9B resume los niveles relativos de CD70 expresado en las líneas de RCC y en las líneas de células epiteliales de riñón normal basándose en la intensidad media de fluorescencia obtenida mediante citometría de flujo. De las 10 líneas de RCC analizadas, se descubrió que 9 expresaban CD70. Estos resultados demuestran que la presencia de los transcritos de CD70 y de la proteína en los carcinomas de riñón fue acompañada por la expresión superficial de CD70 en las células cancerosas.

Ejemplo 7: Efecto Inhibidor de la Proliferación y Citotóxico de ADCs Anti-CD70 sobre Líneas Celulares de Carcinoma de Células Renales CD70⁺

Para examinar las respuestas de las líneas de RCC CD70⁺ a los ADCs de 1F6, se sembraron de 1.000 a 3.000 células por pocillo en 100 μ l de medio. Se añadieron 100 μ l adicionales de medio de cultivo que contenían dosis graduadas de ADCs a los pocillos, y se dejó que las células se unieran durante la noche. Además de la síntesis de ADN, también se analizó la viabilidad celular, como reflejo de la actividad citotóxica de los ADCs, mediante la reducción de alamarBlueTM (Biosource International, Camarillo, CA). El colorante alamarBlueTM se añadió a una dilución uno a cuatro durante las últimas 4 a 24 horas de la incubación. La reducción del colorante se analizó mediante espectrometría de fluorescencia mediante el uso de las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, se comparó la cantidad de ³H-TdR incorporada o el grado de reducción de alamarBlueTM por las células tratadas con el de las células de control sin tratar. La Figura 10 muestra el efecto de 1F6-vcAFP sobre la proliferación (incorporación de ³H-TDR) y la viabilidad (reducción de alamarBlueTM) en dos líneas de RCC CD70⁺ representativas. 1F6-vcAFP mostró una actividad inhibidora potente de la proliferación (Figura 10, panel superior) y citotóxica (Figura 10, panel inferior) sobre las células Caki-1 y 786-O, y los efectos máximos se alcanzaron a concentraciones menores de 0,1 μ g/ml. En contraste, el IgG-vcAFP de control sin unión a concentraciones menores de 1 μ g/ml ejerció efectos mínimos sobre estas células.

La Figura 11 resume las CI₅₀s para 1F6-vcMMAE, 1F6-vcAFP, y 1F6-vcMMAF en la inhibición de la proliferación y la inducción de la citotoxicidad en células de RCC y en células epiteliales de los túbulos renales normales. 1F6-vcMMAE fue muy eficaz en la inhibición de la proliferación de las células Caki-1 y Caki-2 con valores de CI₅₀ menores de 20 ng/ml. Sin embargo, no fue activo sobre otras líneas de RCC CD70⁺, las células Hs 835.T CD70⁻, o las líneas epiteliales de riñón normal RPTEC y HRCE. Los valores de CI₅₀ para la inhibición de la proliferación mediante 1F6-vcAFP oscilaron en 2-247 ng/ml para las líneas de RCC CD70⁺. Se obtuvieron valores de CI₅₀ sustancialmente mayores para 1F6-vcAFP sobre Hs 835.T CD70⁻, lo que sugiere la selección específica como objetivo de CD70. 1F6-vcMMAF fue también activo en la inhibición de la proliferación en todas las líneas de RCC CD70⁺ analizadas, con valores de CI₅₀ menores de 30 ng/ml. La inhibición de la proliferación fue paralela a la citotoxicidad. Los valores de CI₅₀ para 1F6-vcAFP para inducir la citotoxicidad estuvieron por debajo de 20 ng/ml en 4 de las 7 líneas de RCC CD70⁺ analizadas, mientras los de 1F6-vcMMAF estuvieron por debajo de 30 ng/ml en 5 de las 7 líneas de RCC CD70⁺ analizadas. La selección específica del objetivo mediante el ADC de 1F6 hacia CD70 se confirmó mediante los valores de CI₅₀ mucho mayores obtenidos para los ADCs de IgG de control sin unión, >1000 ng/ml para todas las líneas analizadas. Además, RCC pareció ser más sensible de forma diferencial hacia la inhibición de la proliferación y la citotoxicidad mediadas por ADC anti-CD70, a pesar de la expresión detectable de CD70, las células epiteliales de riñón normal fueron muy insensibles a los ADCs de 1F6 en comparación con las líneas de RCC CD70⁺.

Ejemplo 8: Eficacia *In Vivo* de 1F6-VcAFP en un Modelo de Xenoinjerto de RCC

Se han usado con éxito xenoinjertos subcutáneos de células Caki-1 como modelos de RCC para analizar la eficacia de los agentes terapéuticos basados en anticuerpos que incluyen un anticuerpo anti-VEGF (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2003, *Anticancer Res.* 23: 1625-30), así como un ADC que consiste en caliqueamicina thetal1 conjugado con un anticuerpo anti- γ -glutamyltransferasa (Knoll *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60: 6089-94). Se analizó la actividad antitumoral *in vitro* de 1F6-vcAFP mediante el uso de xenoinjertos de la línea Caki-1 en ratones atímicos. Para establecer los tumores Caki-1, se inyectaron subcutáneamente a ratones atímicos 5×10^6 células Caki-1 en 0,2 ml de PBS. El tamaño medio del tumor se incrementó hasta más de 500 mm^3 en 55 días tras la inyección. Los tumores que contenían Caki-1 se extirparon del ratón que tenía el tumor y se prepararon bloques de tejido tumoral de aproximadamente 30 mm^3 . Se implantó subcutáneamente un bloque tumoral de 30 mm^3 en ratones atímicos sin exposición previa para usarlos en el estudio de la actividad antitumoral *in vivo* del ADC anti-CD70. Tras la implantación, los tamaños tumorales se incrementaron hasta más de 800 mm^3 en 40 días en ausencia de tratamiento (Figura 12). El tratamiento se inició cuando el tamaño tumoral medio en un grupo fue aproximadamente 100 mm^3 (Figura 12, flechas). Se detectó muy poca actividad terapéutica en 1F6, ya que la velocidad de crecimiento tumoral en los ratones tratados con 1F6 fue prácticamente idéntica a la del grupo de control sin tratar o a la del grupo tratado con IgG. Sin embargo, el tratamiento de los ratones con 1F6-vcAFP inhibió significativamente el crecimiento tumoral. El tamaño tumoral medio en los ratones tratados con 1 mg/ml de 1F6-vcAFP fue $<600 \text{ mm}^3$ 56 días tras el inicio del tratamiento, mientras en el grupo tratado con IgG-vcAFP a la misma dosis el tamaño tumoral medio ya fue $>600 \text{ mm}^3$ 20 días tras el inicio del tratamiento (Figura 10, panel superior). El incremento de la dosis de 1F6-vcAFP hasta 3 mg/ml inhibió adicionalmente el crecimiento tumoral; el tamaño tumoral medio se mantuvo por debajo de 200 mm^3 70 días tras el inicio del tratamiento, mientras IgG-vc-AFP a la misma dosis dio como resultado tumores $>400 \text{ mm}^3$ 42 días tras el inicio del tratamiento (Figura 12, panel superior). La actividad antitumoral *in vivo* potente y específica de 1F6-vcAFP a 3 mg/kg de un experimento distinto se muestra en la Figura 12, panel inferior.

Ejemplo 9: Expresión de CD70 en Células T Activadas

La generación y el mantenimiento de los clones de células T se ha descrito en la solicitud de patente internacional PCT/US02/37223. Para activar los clones de células T en reposo, se incubaron 5×10^6 células T en RPMI-1640 complementado con un 10% de FBS y L-glutamina 2 mM con PHA-L (1-2 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma), 10×10^6 células de soporte irradiadas (CESS), rIL-2 (200 U/ml) (Proleukin, Chiron, Emeryville, CA), e IL-4 (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los clones de células T se dejaron expandir normalmente durante 10-14 días antes de la re-estimulación. Se examinó la expresión de CD70 en un panel de clones de células T inespecíficas para el antígeno. La Tabla 2 resume las características de los clones de células T examinados. Este panel contiene clones de células T CD4^+ y CD8^+ T que parecen pertenecer a diferentes rutas de diferenciación de células T, tal como sugieren sus perfiles de citocinas. Fueron detectables niveles significativos de CD70 en todos los clones examinados. Los clones de células T se activaron mediante PHA, células de soporte irradiadas (CESS), y rIL-2, y se monitorizó la expresión de CD25 y CD70 mediante análisis de citometría de flujo. El clon C1A, representativo de otros clones de células T, mostró una estimulación considerable de CD25, que fue máxima en el día 2 (Figura 13). Esto es indicativo de la activación de los linfocitos T. La expresión de CD25 disminuyó gradualmente en los siguientes días. La inducción de la expresión de CD70 fue paralela a la de CD25. La inducción de CD70 máxima se observó también después de 2 días de estimulación. Todavía fue detectable una expresión de CD70 considerable en el día 8. Todos los clones de células T examinados, que incluían los enumerados en la Tabla 2, mostraron similares cinéticas y magnitudes de expresión de CD70 inducida por la activación.

Tabla 2: Fenotipos de los clones de células T y expresión de CD70 inducida por la activación

Clon de células T	Fenotipo			
	Marcador de linaje T	Expresión de CD70*	Perfil de citocinas	Denominación
3.27.2	CD3, CD4	15	IL-4, IL5, IL-13, IFN γ	Th0
4.01.1	CD3, CD4	7	IL-4, IL5, IL-13, IFN γ	Th0
20G5	CD3, CD4	3	IL-4, IL-13	Th2
40D8	CD3, CD4	8	IL-4, IL-13	Th2
C1A	CD3, CD8	3	IL-4, IL-13, IFN γ	Tc0
C2A	CD3, CD8	12	IL-4, IL-13, IFN γ	Tc0

* Proporción entre las intensidades de fluorescencia logarítmicas medias para la unión anti-CD70 y la IgG de control

Ejemplo 10: Efecto Inhibidor de la Proliferación de los ADCs Anti-CD70 sobre las Células T Activadas

Se examinó el efecto de los ADCs de 1F6 sobre la proliferación de las células T activadas mediante el uso de clones de células T activadas, reacciones mixtas de linfocitos (MLR), y células T sensibilizadas con antígenos.

Se usaron ensayos de proliferación habituales en formato de 96 pocillos por cuadruplicado para estudiar el efecto de los ADCs anti-CD70 sobre las células T activadas. Para la MLR, se sembraron PBMCs a 50.000 células/pocillo con 50.000 células CESS alogénicas irradiadas en un volumen total de 200 μ l de medio. Para la proliferación de las células T inducida por el toxoide tetánico, se sembraron células T reactivas con el toxoide tetánico a 20.000 células/pocillo con 2.000 DCs autólogas en un volumen total de 200 μ l. Se usó un toxoide tetánico dializado y clarificado (Colorado Serum Company, Denver, CO) a una concentración final de una dilución 1:50. Se sembraron clones de células T activadas durante dos días a 10.000 células por pocillo. Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo normalmente durante 72 a 120 horas. Se usó la incorporación de timidina tritiada (3 H-TdR) durante las últimas 16 horas de incubación y el recuento de centelleo para determinar la síntesis de ADN. Para los análisis, se comparó la cantidad de timidina incorporada por las células tratadas con la de las células de control sin tratar.

En el primer sistema, se examinaron las respuestas de los clones de células T hacia los ADCs de 1F6. Los clones de células T en reposo se activaron para inducir la expresión de CD70 tal como se describe en la Figura 13. Después de 2 días de activación, se analizó la expresión de CD25 y CD70 en una porción de las células mediante citometría de flujo para confirmar la activación celular y la inducción de CD70. Las células restantes se sedimentaron y se resuspendieron en un medio nuevo que contenía 200 UI/ml de rIL-2 ó 200 UI/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-4. Las células se colocaron en placas a 10.000 células/pocillo en un volumen final de 200 μ l de medio que contenía concentraciones graduadas de ADCs de 1F6 o los ADCs de IgG sin unión. Las células se incubaron durante 72 horas adicionales, y las últimas 16 horas se pulsaron con 3 H-TdR para determinar la síntesis de ADN celular. Los resultados para las respuestas de los tres clones de células T hacia el tratamiento con ADC se muestran en la Figura 14. Los ADCs de 1F6 a concentraciones mayores de 0,01 μ g/ml inhibieron significativamente la proliferación de los clones de células T. 1F6-vcAFP pareció ser más activo que 1F6-vcMMAE; se descubrió que las CI_{50} s para 1F6-vcAFP en los 3 clones era menor de 0,05 μ g/ml. El ADC de control clgG-vcMMAE y clgG-vcAFP no inhibió de manera significativa la proliferación a concentraciones por debajo de 2 μ g/ml, lo que confirma la especificidad por el antígeno de los ADCs de 1F6.

En el segundo sistema, se estableció una MLR entre PBMC y CESS estimuladoras alogénicas irradiadas. La activación alogénica de las células T de sangre periférica se llevó a cabo mediante reacciones mixtas de linfocitos (MLR) convencionales. Las MLR se iniciaron mezclando PBMCs y células linfoblastoides B transformadas con el virus de Epstein-Barr (EBV) CESS alogénicas irradiadas (ATCC, Manassas, VA) a una proporción de una célula T respecto de diez células irradiadas. La densidad de las células T se ajustó a $0,25 \times 10^6$ células T/ml de RPMI-1640 complementado con un 10% de FBS y L-glutamina 2 mM. Se observó una proliferación y expansión rápida de las células T alorreactivas después de aproximadamente 96 horas de cultivo. Después de 5 días de estimulación, se estudió la expresión de CD70 en las células mediante el uso del anticuerpo mAb anti-CD70 1F6 mediante citometría de flujo. Los análisis de citometría de flujo demostraron que la mayoría de las células en la puerta viable fueron células T CD3⁺, y que CD70 se expresó en las células T CD3⁺ viables. La Figura 15, panel superior, muestra la expresión de CD70 al final de la MLR (120 horas tras el inicio). En cultivos paralelos en placas de 96 pocillos, se incluyeron dosis graduadas de 1F6-vcMMAE o 1F6-vcAFP en los cultivos en el inicio. Se analizó la síntesis de ADN durante las últimas 16 horas del quinto día de cultivo mediante un pulso de 3 H-TdR. Tanto 1F6-vcMMAE como 1F6-vcAFP inhibieron sustancialmente la proliferación de las células T (Figura 15, panel inferior). 1F6-vcAFP fue más activo que 1F6-vcMMAE, con una CI_{50} de aproximadamente 0,1 μ g/ml.

En el tercer sistema, se examinó el efecto de los ADCs de 1F6 sobre la proliferación de células T inducida por antígenos. Para determinar la activación de las células T específicas del antígeno, se enriquecieron las células T específicas contra el toxoide tetánico a partir de PBMC mediante múltiples rondas de estimulación antigénica con toxoide tetánico en presencia de DCs autólogas. Antes de la estimulación antigénica de las células T, se prepararon DCs autólogas maduras pulsadas con toxoide tetánico como se describió anteriormente. Después se co-cultivaron PBMC autólogos con DCs maduras pulsadas con antígeno en una proporción de 10 PBMC respecto de 1 DC. A la densidad de $0,25-0,5 \times 10^6$ PBMCs/ml de RPMI-1640 complementado con un 10% de FBS y L-glutamina 2 mM. Se dejó continuar la activación y la expansión de las células T durante 7 días. Las células T viables se recogieron del cultivo y se re-estimularon con DCs maduras autólogas pulsadas con toxoide tetánico de nuevo en condiciones idénticas a las de la primera ronda de activación. Se llevaron a cabo dos rondas adicionales idénticas de activación, para enriquecer adicionalmente las células T específicas del toxoide tetánico.

Las células T específicas del toxoide tetánico se enriquecieron y se expandieron mediante cuatro rondas consecutivas de estimulación con toxoide tetánico y DCs autólogas tal como se describió anteriormente. Tras la 4ª ronda de estimulación, se colocaron las células T específicas de toxoide tetánico en reposo en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en presencia de DCs autólogas (a 2.000 células/pocillo) y toxoide tetánico. También se incluyeron dosis graduadas de 1F6, 1F6-vcMMAE, y 1F6-vcAFP en los cultivos en el inicio. Se analizó la síntesis de ADN durante las últimas 16 horas mediante la incorporación de 3 H-TdR. El 1F6 sin conjugar no mostró un efecto significativo sobre la proliferación de las células T inducida por el toxoide tetánico, a la vez que tanto 1F6-vcMMAE como 1F6-vcAFP ejercieron una inhibición sustancial a dosis superiores a 0,03 μ g/ml (Figura 16).

Ejemplo 11: Expresión de CD70 en Células T Activadas durante una Respuesta Inmunitaria *In Vitro* Específica de Antígeno

Un péptido de 9 aminoácidos (GILGFVFTL, péptido M1) derivado de la proteína de la matriz del virus de la gripe se une al hueco de unión de péptidos de la molécula HLA-A0201. La presentación del péptido M1 por las células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A0201 a las células T autólogas estimula específicamente la activación y la expansión de las células T citotóxicas CD8⁺ que expresan la cadena Vβ17 del receptor de las células T (Lehner *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 181:79-91), lo que constituye un sistema experimental *in vitro* conveniente para seguir la activación y la expansión de las células T específicas de antígeno hasta su antígeno relacionado.

Para examinar la expresión de CD70 en las células T específicas de antígeno activadas, se estimularon PBMCs de un donante normal que expresaba HLA-A0201 con el péptido M1. Los PBMCs se sembraron a 2×10^6 células/ml con 5 µg/ml de péptido M1 en medio AIMV complementado con un 5% de suero AB humano. Se añadió IL-2 (Proleukin, Chiron) e IL-15 (R&D Systems, MN) a concentraciones finales de 20 UI/ml y 5 ng/ml, respectivamente, una vez cada dos días comenzando en el día 2 tras el inicio del cultivo. La expansión de las células T CD8⁺/Vβ17⁺ y la inducción de CD70 en CD8⁺/Vβ17⁺ se siguió mediante citometría de flujo de tres colores. Las células T Vβ17⁺ se identificaron mediante el clon de mAb anti-TCRVβ17 E17.5F3 (Beckman Coulter, Miami, FL). Los resultados de un experimento representativo se muestran en las Figuras 17A y B. La Figura 17A, paneles superiores, muestra que solamente un 0,9% de las células dentro de la población de linfocitos fueron CD8⁺/Vβ17⁺ dos días después del inicio del cultivo. La expansión de las células T fue evidente solamente en la población CD8⁺/Vβ17⁺. El porcentaje de CD8⁺/Vβ17⁺ se incrementó progresivamente hasta un 23% en el día 11. La expresión de CD70 se hizo detectable 3 días después de la estimulación con el antígeno (Figura 17A, panel inferior). En el día 7, aproximadamente un 60% de las células CD8⁺/Vβ17⁺ en expansión expresaron CD70 (Figura 17A, panel inferior izquierdo). El nivel más elevado de expresión de CD70 tal como se indica mediante la intensidad de fluorescencia media (IFM) se detectó también en el día 7 (Figura 17A, panel inferior derecho). El porcentaje de células CD70⁺/CD8⁺/Vβ17⁺ y la IFM de la expresión de CD70 en CD8⁺/Vβ17⁺ comenzó a declinar posteriormente. Mientras CD70 se expresó claramente en las células CD8⁺/Vβ17⁺, no se pudo detectar CD70 en las células CD8⁺/Vβ17⁻ (Figura 17B). Estos resultados confirmaron que la inducción de CD70 se limitó a las células T activadas que respondían a la estimulación antigénica, pero no a las células T circundantes inespecíficas hacia el antígeno.

Ejemplo 12: Eliminación *In Vitro* de Células T Específicas de Antígeno CD70⁺ Mediante los ADCs Anti-CD70

Se estimularon PBMCs de un donante normal que expresaban HLA-A0201 con el péptido M1 tal como se describió en el Ejemplo 11. En el día 5, se recogieron las células, se lavaron, y se re-sembraron a $0,5-1 \times 10^6$ células/ml (aproximadamente 100.000 células T CD8⁺/Vβ17⁺) en medio AIMV fresco complementado con un 5% de AB humano, 20 UI/ml de IL-2, y 5 ng/ml de IL-15. Se añadieron ADCs de 1F6 o de IgG de control sin unión (clgG) a ciertos cultivos hasta una concentración final de 1 µg/ml. Se llevaron a cabo los recuentos de las células viables totales 24, 48, y 76 horas tras la adición del ADC. Se llevó a cabo una citometría de flujo de dos colores para determinar los porcentajes de células CD8⁺/Vβ17⁺ entre las células viables. Después se calculó el número absoluto de células T CD8⁺/Vβ17⁺ en cada cultivo. El número de células T CD8⁺/Vβ17⁺ en los dos cultivos de control se incrementó hasta más de 800.000 después de 76 horas (Figura 18, panel superior). Se observó una inhibición sustancial de la expansión de células T CD8⁺/Vβ17⁺ en los cultivos tratados con ADC de 1F6. El número de células T CD8⁺/Vβ17⁺ fue aproximadamente 400.000 en el cultivo tratado con 1F6-vcMMAE, en comparación con >800.000 en el cultivo tratado con clgG-vcMMAE. Prácticamente no se dio expansión de células T CD8⁺/Vβ17⁺ en el cultivo tratado con 1F6-vcAFP, mientras hubo presentes >500.000 células T CD8⁺/Vβ17⁺ en el cultivo tratado con clgG-vcAFP. También se estudió el efecto de los ADCs de 1F6 sobre las células CD8⁺/Vβ17⁻. La Figura 18, panel inferior, demuestra que las células CD8⁺/Vβ17⁻ de los cultivos tratados con 1F6-vcAFP y 1F6-vcMMAE fueron <40% y <20%, respectivamente, del cultivo de control sin tratar al final del experimento. En contraste, las células CD8⁺/Vβ17⁻ circundantes inespecíficas para el antígeno en los cultivos tratados con ADC fueron >60% del cultivo sin tratar. Estos resultados demuestran que los ADCs de 1F6 seleccionaron como objetivo específicamente a las células T CD70⁺/CD8⁺/Vβ17⁺ y ejercieron efectos limitados sobre las células T CD70⁻/CD8⁺/Vβ17⁻ que se hallaban en el mismo cultivo, lo que sugiere una toxicidad limitada en las células circundantes de los ADCs de 1F6.

Se comparó la potencia de los tres ADCs de 1F6. Se estimularon PBMCs de HLA-A0201 con el péptido M1 y se re-sembraron como se describió para la Figura 18 con los diversos ADCs a las concentraciones indicadas (Figura 19). Se determinó el porcentaje de células T CD8⁺/Vβ17⁺ después de una incubación de 96 horas. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de la expansión de las células T CD8⁺/Vβ17⁺ con 1F6-vcMMAE, -vcAFP, y -vcMMAF, mientras los ADCs de control de IgG correspondientes a la concentración máxima de 1 µg/ml no mostraron una actividad inhibidora detectable en comparación con el cultivo de control sin fármaco. Los valores de CI₅₀ de 1F6-vcAFP y 1F6-vcMMAF estuvieron entre 0,1 y 0,01 µg/ml. La actividad inhibidora de 1F6-vcMMAE pareció ser más débil que la de 1F6-vcAFP y 1F6-vcMMAF.

Se usó un ensayo de re-estimulación para estudiar la capacidad funcional de las células T CD8⁺/Vβ17⁻ circundantes inespecíficas para el antígeno. Se estimularon PBMCs que expresaban HLA-A0201 con el péptido M1 y después se trataron con 1 µg/ml de 1F6-vcMMAF en el día 5 para eliminar las células T CD70⁺/CD8⁺/Vβ17⁺ tal como se describió en las Figuras 18 y 19. Tal como se esperaba, el número de células T CD8⁺/Vβ17⁺ en el cultivo tratado con ADC fue menor que en el cultivo sin tratar, un 14% frente a un 47% (Figura 20, columna izquierda). Se estudiaron

las respuestas de las células restantes a una re-estimulación mitógena. Para normalizar el número de células T V β 17⁻ usadas en el ensayo de re-estimulación y minimizar la contribución de las células T CD8⁺/V β 17⁺ a la respuesta de proliferación, las células T V β 17⁻ se enriquecieron mediante una inmunoselección negativa. Brevemente, el día 9 se recogieron las células, se lavaron, y se resuspendieron hasta 5 x 10⁷ células/ml en medio que contenía un mAb anti-TCRV β 17 (clon E17.5F3) a 1-2 μ g/10⁶ células T objetivo. Tras la incubación a 4 °C durante 30 minutos, el mAb anti-TCRV β 17 sin unir se eliminó lavando las células dos veces con PBS que contenía un 0,1% de suero humano. Las células se resuspendieron a una concentración de 2-5 x 10⁶/ml, se hicieron dos lavados en medio y se añadieron esferas paramagnéticas de IgG anti-ratón de cabra Dynabeads M-450 (DynaL Biotech Inc., Lake Success, NY) a una proporción de 4 esferas paramagnéticas respecto de 1 célula T objetivo. La mezcla se hizo rotar a 4 °C durante 30 minutos. Las esferas paramagnéticas con células T V β 17⁺ unidas se separaron después del resto de las células mediante un dispositivo magnético. La retirada de las células T V β 17⁺ se confirmó mediante citometría de flujo de dos colores. La Figura 20, columna media, demuestra que solamente un 3% y un 5% de las células quedaron en los cultivos tratados con 1F6-vcMMAF y sin tratar, respectivamente. Se usaron Anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados en pocillos de cultivo de tejidos a concentraciones graduadas para re-estimular las células V β 17⁻ en ausencia de cualquier IL-2 exógena. Se sembraron veinte mil células V β 17⁻ por pocillo en placas de 96 pocillos en un total de 200 μ l de medio AIMV complementado con un 5% de suero humano. Las células se cultivaron durante 96 horas, y se analizó la síntesis de ADN mediante la incorporación de ³H-TdR durante las últimas 18 horas de cultivo. Las células T V β 17⁻ enriquecidas a partir del cultivo tratado con 1F6-vcMMAF mostraron una respuesta dependiente de la dosis hacia la re-estimulación con anti-CD3 más anti-CD28 comparable a la de las células sin tratar. Esto sugiere que, aunque las células T V β 17⁻ se incubaron con las células CD8⁺/V β 17⁺ en presencia de 1F6-vcMMAF durante 4 días, mantuvieron su capacidad de proliferación. De manera más importante, su capacidad para generar una respuesta de proliferación en ausencia de IL-2 exógena ilustra que también estaban funcionalmente intactas con respecto a su capacidad de expresar y secretar la(s) citocina(s) necesaria(s) para su proliferación. En conjunto, estos resultados sugieren que los ADCs anti-CD70 pueden eliminar de manera selectiva las células T activadas CD70⁺ sin provocar un daño colateral sustancial a las células T circundantes. Esta característica sugiere que se pueden aplicar como agentes inmunosupresores que pueden tener un impacto mínimo sobre el repertorio inmunitario del hospedador.

Ejemplo 13: Tratamiento de la Encefalomiелitis Alérgica Experimental Mediante la Administración de ADCs Anti-CD70

Los estudios indican un papel para las interacciones célula T-célula T mediadas por CD70/CD27 en el aumento de las respuestas inmunológicas mediadas por Th₁ en las enfermedades autoinmunitarias mediadas por células, que incluyen, por ejemplo, las enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias. En este ejemplo, se trata la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo animal de la enfermedad desmielinizante esclerosis múltiple (MS), con un ADC que comprende un anticuerpo que (a) está conjugado con AFP o MMAE con un enlazador de val-cit (vc) y (b) reconoce un epítipo de CD70 murino que corresponde al epítipo de 1F6 de CD70 humano.

Inducción y evaluación clínica de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE): Se induce R-EAE (EAE recidivante) en ratones SJL hembra de seis a siete semanas de edad mediante inmunización subcutánea con 100 μ l de una emulsión de adyuvante completo de Freund (CFA) que contiene 200 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y 40 μ g del epítipo inmunodominante de la proteína proteolipídica, PLP₁₃₉₋₁₅₁. Los síntomas de EAE se puntúan en una escala de 0 a 5 como sigue: (0) normal; (1) cola flácida o debilidad de las extremidades posteriores; (2) cola flácida y debilidad de las extremidades posteriores (marcha de pato); (3) parálisis parcial de las extremidades posteriores; (4) parálisis completa de las extremidades posteriores; y (5) moribundo. Una recidiva se define como un incremento sostenido (más de 2 días) en al menos un grado completo de la puntuación clínica después de que el animal haya mejorado previamente al menos una puntuación clínica completa, y se haya estabilizado durante al menos 2 días. Los datos se representan como la puntuación clínica media para todos los animales en un grupo de tratamiento particular o como la tasa de recidiva (número total de recidivas en un grupo dividido por el número total de ratones en ese grupo).

Regímenes de Administración de ADC Anti-CD70: Se administra el ADC anti-CD70 (0,1-3 mg/g de peso corporal) de forma intraperitoneal en un volumen total de 100 μ l. Los ratones se tratan 3 veces por semana durante 3 semanas consecutivas (9 tratamientos en total). El tratamiento se inicia antes del inicio de la enfermedad (día 7) o en el punto culminante de la enfermedad aguda (día 14). Como control, se deja sin tratar un grupo de ratones en los que se ha inducido la EAE.

Inhibición de la inducción mediante TNF- α e IFN- γ : La demostración de la inducción de TNF- α y IFN- γ en cerebros de EAE muestra un proceso de enfermedad inflamatoria indicativo de la progresión de la enfermedad EAE, y la inhibición de estas citocinas en los cerebros de ratones SJL tratados con ADC anti-CD70 indica el valor de la terapia de ADC anti-CD70 en la prevención o el tratamiento de la EAE. Los cerebros se obtienen de al menos tres animales tratados de forma preclínica (en el día 13, después de tres tratamientos, y en el día 26, después de nueve tratamientos) y en el punto culminante de la enfermedad aguda (en el día 20, después de tres tratamientos, y en el día 33, después de nueve tratamientos). Los cerebros se fijan (10% de formalina tamponada), y los tejidos se incrustan en parafina y se cortan. Los cortes se tiñen después independientemente para TNF- α o IFN- γ mediante incubación con un anticuerpo primario específico para la citocina respectiva, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los cortes de tejido se montan después en medios de montaje y se

analizan mediante microscopia de inmunofluorescencia. Los niveles disminuidos de tinción de TNF- α o INF- γ en los ratones tratados con ADC frente a los ratones a los que se ha inducido EAE sin tratar muestra la inhibición de la inducción de citocinas inflamatorias mediante el uso de la terapia de ADC anti-CD70.

- 5 *Inhibición de los Síntomas de la Enfermedad o de las Tasas de Recidiva:* Los ratones SJL a los que se indujo la EAE del grupo de tratamiento se comparan con los ratones a los que se indujo la EAE sin tratar para determinar la eficacia de la terapia de ADC anti-CD70 para prevenir el inicio de la enfermedad o para tratar la enfermedad establecida. Para los ratones tratados de manera preclínica, una disminución de la puntuación media de la enfermedad de EAE, en comparación con el grupo de control sin tratar, demuestra la eficacia de la terapia de ADC anti-CD70 en la prevención de la enfermedad. Para los ratones tratados en el punto culminante de la enfermedad
- 10 aguda, (a) una disminución de la tasa de recidivas o (b) una disminución de la puntuación media tras el tratamiento para EAE, en comparación con el grupo de control sin tratar, demuestra la eficacia de la terapia de ADC anti-CD70 en el tratamiento de la enfermedad establecida.

Listado de secuencias

<110> Seattle Genetics, Inc.

<120> Conjugados de anticuerpos anti-cd70-fármaco y su uso para el tratamiento de cáncer y trastornos inmunológicos

5 <130> N.95684C SER

<150> US 60/449,055

<151> 2003-02-20

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210> 1

<211> 411

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 1

```

atggcctggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaagtgc ccaagcacag      60
atccagttgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc      120
tgcaaggcctt ctgggtatac cttcaciaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca      180
ggaaaggggtt taaagtggat gggctggata aacacctaca ctggagagcc aacatatgct      240
gatgccttca agggacgggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg      300
cagatcaaca acctcaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag agactacggc      360
gactatggta tggactactg gggcaagga acctcagtca ccgtctctc a                   411

```

15

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

20 <213> mus musculus

<400> 2

ES 2 457 538 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

5 <213> mus musculus

<400> 3

atggcttggg tgggacct gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagca 57

<210> 4

<211> 19

10 <212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Ala

<210> 5

15 <211> 30

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 5

gggtataacct tcacaaacta tggaatgaac 30

20 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 7
 <211> 51
 <212> DNA
 5 <213> mus musculus

<400> 7

tggataaaca cctacactgg agagccaaca tatgctgatg cctcaaggg a 51

<210> 8
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 8

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe Lys

1 5 10 15

Gly

15 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 9

20 gactacggcg actatggtat ggactac 27

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

25 <400> 10

Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5

30 <210> 11
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 11

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcactggtat 180
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 240
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ggttccgtgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgg 396

ES 2 457 538 T3

<210> 12
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5 <400> 12

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
 35 40 45
 Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 13
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> mus musculus

10

<400> 13

atggagacag acacactct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> mus musculus

15

<400> 14

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 20

<210> 15
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> mus musculus

20

<400> 15

agggccagca aaaggtcag tacatctggc tatagttta tgcac 45

<210> 16

<211> 15

5 <212> PRT

<213> mus musculus

<400> 16

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

<210> 17

10 <211> 21

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 17

cttgcaccca acctagaatc t 21

<210> 18

15 <211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 18

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

20

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 19

25

cagcacagta gggaggtcc gtggacg 27

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

30 <213> mus musculus

<400> 20

Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 21

<211> 411

35 <212> DNA

<213> mus musculus

<400> 21

ES 2 457 538 T3

atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgccagtaa ctgcagatgt ccaatcccag 60
 gttcagctgc aacagctctgg aactgagctg atgacgcctg gggcctcagt gacgatgtcc 120
 tgcaagactt ctggctacac attcagtacc tactggatag agtgggtaaa acagaggcct 180
 ggacatggcc ttgagtggat tggagaaatt ttacctggaa gtggttatac tgactacaat 240
 gagaagtcca aggccaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300
 caactcagca gcctggcatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atgggatagg 360
 ctctatgcta tggactactg gggccaagga acctcagtca ccgtctcctc a 411

5 <210> 22
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 22

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Met Thr
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Thr Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Ser Thr Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Gly Pro Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Arg Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

10 <210> 23
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 23

atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcagatgt ccaatcc 57

15 <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 24

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Asp
 1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 5 <213> mus musculus

<400> 25

ggctacacat tcagtaccta ctggatagag 30

<210> 26
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 26

Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 27
 15 <211> 51
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 27

gaaatttac ctggaagtgg ttatactgac tacaatgaga agtcaaggc c 51

<210> 28
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 28

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

Ala

<210> 29
 25 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 29

tgggataggc tctatgctat ggactac 27

<210> 30
 30 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> mus musculus

<400> 30

Trp Asp Arg Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

ES 2 457 538 T3

<210> 31
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> mus musculus

5 <400> 31

```

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttaactgtat ctctggggca gaagaccacc      120
atctcatgca gggccagcaa gagggtcagt acatctggct atagttttat gcactgggtac      180
caactgaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc ttgcgtccaa cctaccatct      240
ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctggggacag acttcaccct caaaatccat      300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gattccgtac      360
acgttcggag gggggaccaaa gctggaaata acacgg                                396
    
```

<210> 32
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> mus musculus

10

<400> 32

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1           5           10          15
Gly ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr
20          25          30
val Ser Leu Gly Gln Lys Thr Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35          40          45
val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro
50          55          60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asp Leu Pro Ser
65          70          75          80
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85          90          95
Leu Lys Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100         105         110
Gln His Ser Arg Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115        120        125
Glu Ile Thr Arg
130
    
```

15 <210> 33
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 33

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

<210> 34

<211> 20

5 <212> PRT

<213> mus musculus

<400> 34

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 35

10 <211> 45

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 35

agggccagca agagtgcag tacatctggc tatagtttta tgcac 45

15 <210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 36

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

20

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> mus musculus

25 <400> 37 21

ctgctgtcca acctaccatc t 21

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

30 <213> mus musculus

<400> 38

Leu Ala Ser Asn Leu Pro Ser
1 5

<210> 39

35 <211> 28

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 39

cagcacagta gggagattcc gtacacgt 28

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5 <400> 40

Gln His Ser Arg Glu Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 41
 <211> 25
 <212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 41

ctccactg acattgatg cttg 25

15 <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 42

caggtcactg tcactggctc ag 22

25 <210> 43
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 43

30 gtcgatgagc tctagaattc gtgccccccc ccccccc 37

<210> 44
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Cebador

<400> 44

cgatcatgtcg acggatccaa gcttcaagaa gcacacgact gaggcac 47

40 <210> 45
 <211> 47
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador
<400> 45
cgtcatgctg acggatccaa gcttgcacc atggagtag tttgggc 47
5 <210> 46
<211> 17
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador
10 <400> 46
ccactgctgc tgattag 17
<210> 47
<211> 18
<212> DNA
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 47
caatgccttc tctgtcc 18
20

REIVINDICACIONES

- 1.Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo que se une a CD70 y un fármaco que es un agente citotóxico seleccionado de un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante o un agente anti-tubulina, y en donde
- 5 (i) el anticuerpo compite por la unión a CD70 con
- (a) un anticuerpo monoclonal IF6 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos enunciada en los restos 20-137 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos enunciada en los restos 21-132 de SEQ ID NO: 12; o
- 10 (b) un anticuerpo monoclonal 2F2 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos enunciada en los restos 20-137 de SEQ ID NO: 22 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos enunciada en 21-132 SEQ NO: 32; o
- (ii) el anticuerpo que comprende las regiones H1, H2, y H3 de SEQ ID NOS: 6, 8 y 10 y que comprenden además las regiones L1, L2, y L3 de SEQ ID NOS: 16, 18 y 20; o
- 15 el anticuerpo que comprende las regiones H1, H2, y H3 de SEQ ID NOS: 26,28 y 30 y que comprende además las regiones L1, L2, y L3 de SEQ ID NOS: 36, 38 y 40; o
- (iii) el anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en los restos 20-137 de SEQ NO: 2 o SEQ ID NO: 22, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos enunciada en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 32.
- 20 2.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el conjugado anticuerpo-fármaco se selecciona del grupo que consiste en 1F6-val-cit-AFP, 1F6-val-cit-MMAE, 2F2-val-cit-AFP, y 2F2-val-cit-MMAE, o una forma quimérica o humanizada del mismo.
- 3.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 4.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano
- 25 5.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 6.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, una enediina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una dolastatina, un mautansinoide y un alcaloide de la vinca.
- 30 7.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el agente citotóxico es AFP, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, morfolinodoxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1, o eleuterobina.
- 8.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el agente citotóxico es un agente anti-tubulina.
- 9.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el agente citotóxico es una auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina, o una dolastatina, o el agente antitubulina es AFP, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicinas, colcimida, cernadotina, discodermolida, maitansina, DM-1, o eleuterobina.
- 35 10.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está conjugado con el agente citotóxico por medio de un enlazador.
- 40 11.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en el que el enlazador es escindible en las condiciones intracelulares, preferiblemente un enlazador peptídico escindible mediante una proteasa intracelular, por ejemplo, el enlazador peptídico es un enlazador dipeptídico, tal como el enlazador dipeptídico comprende un enlazador val-cit o un péptido phe-lys.
- 45 12.El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 11, en el que el enlazador escindible es hidrolizable a un pH menor que 5,5 o donde el enlazador hidrolizable es un enlazador de hidrazona, o donde el enlazador escindible es un enlazador de disulfuro.

Figura 1

Secuencia nucleotídica de VL de 1F6:

1 atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 61 gacattgtgc tgacacagtc tectgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120
 121 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcaactggtat 180
 181 caacagaaac caggacagcc accaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 240
 241 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggtg tctgggacag acttcaacct caacatccat 300
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaasctat tactgtcagc acagtaggga ggttccgtgg 360
 361 acgttcggtg gaggaccaa gctggaaatc aaacgg 396

Secuencia de aminoácidos de VL de 1F6:

-20 METDTLLLMV LLLWVFGSTG 0
 1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYFMHWY QOKPQQPKL LIYLASNLES 60
 61 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEDAATY YCQHSREV^{PN} TFGG^{TKLEI} KR 112

Secuencia nucleotídica de VH de 1F6:

1 atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg ccaaagtgc ccaagcacag 60
 61 atccagttgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
 121 tgcaaggctt ctgggtatac ctccacaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
 181 gaaaaggggtt taaagtggat gggctggata aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240
 241 gatgccttca agggacgggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300
 301 cagatcaaca acctcaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag agactacggc 360
 361 gactatggta tggactactg ggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc a 411

Secuencia de aminoácidos de VH de 1F6:

-19 MAWVWTLFL MAA^QSAGA 0
 1 QIQLVQSGPE VKKPGETVKI SCKAGY^{TFT} NYGMN^VWV^{KQA} PGKGLK^WM^{GW} INTY^TGE^{PTY} 60
 61 ADA^{FKGR}FAP SLETSASTAY LQIN^NLK^{NED} TATY^FCA^RDY GDY^{GMD}Y^WGQ GTS^VTV^{SS} 118

Figura 2

Secuencia nucleotídica de VL de 2F2:

1 atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 61 gacattgtgc tgacacagtc tctgtcttcc ttaactgtat ctctggggca gaagaccacc 120
 121 atctcatgca gggccagcaa gagtgtcagt acatctggct atagttttat gcaactggtac 180
 181 caactgaaac caggacagtc accaaactc ctcatctatc ttgctgcca cctaccatct 240
 241 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggtg tctgggacag acttcaccct caaatccat 300
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gattccgtac 360
 361 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata acacgg 396

Secuencia de aminoácidos de VL de 2F2:

-20 METDTLLLV LLLWVPGSTG 0
 1 DIVLTQSPAS LTVSLGQKTT ISCRASKSVS TSGYSFMHWY QLKPGQSPKL LIYLASNLPSS 60
 61 GVPARFSGSG SGTDFTLKIH PVEEDAATY YCOHSREIPY TFGGGTKLLEI TR 112

Secuencia nucleotídica de VH de 2F2:

1 atggaatgga cctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctgcagatgt ccaatcccag 60
 61 gttcagctgc aacagtctgg aactgagctg atgacgcctg gggcctcagt gacgatgtcc 120
 121 tgcaagactt ctggctacac attcagtacc tactggatag agtgggtaaa acagaggcct 180
 181 ggacatggcc ttgagtggat tggagaaatt ttacctggaa gtggttatac tgactacaat 240
 241 gagaagtcca aggcccaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300
 301 caactcagca gcctggcatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atgggatagg 360
 361 ctctatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcttc a 411

Secuencia de aminoácidos de VH de 2F2:

-19 MEWTWVFLFL LSVTADVQS 0
 1 QVQLQQSGTE LMTPGASVTM SKTSGYTFPS TYNIIEWVKQR POGLEWIGE ILGPSGYTDY 60
 61 NEKFKAKATF TADTSSNTAY MQLSSLASED SAVYYCARWD RLYAMDYWG GTSVTVSS 118

Figura 3

1F6 CDR-L1 (residuos 23 a 38):	R A S K S V S T S G Y S F M H
2F2 CDR-L1 (residuos 23 a 38):	R A S K S V S T S G Y S F M H
1F6 CDR-L2 (residuos 54 a 60):	L A S N L E S
2F2 CDR-L2 (residuos 54 a 60):	L A S N L P S
1F6 CDR-L3 (residuos 93 a 101):	Q H S R E V P W T
2F2 CDR-L3 (residuos 93 a 101):	Q H S R E I P Y T
1F6 CDR-H1 (residuos 26 a 35):	G Y T F T N Y G M N
2F2 CDR-H1 (residuos 26 a 35):	G Y T F S T Y Y W I E
1F6 CDR-H2 (residuos 49 a 66):	W I N T Y T G E P T Y A D A F K G
2F2 CDR-H2 (residuos 49 a 66):	E I L G P S G Y T D Y N E K F K A
1F6 CDR-H3 (residuos 99 a 107):	D Y G D Y G M D Y
2F2 CDR-H3 (residuos 99 a 107):	W D R L Y A M D Y

Figura 4

CA46 Ramos	Linfoma de Burkitt americano Linfoma de Burkitt americano	ATCC ATCC	3,3 3,2
DAUDI HS Sultan Raji	Linfoma de Burkitt africano Linfoma de Burkitt africano Linfoma de Burkitt africano	ATCC ATCC ATCC	2,6 5,5 5,4
MC116 Toledo	Linfoma B indiferenciado Linfoma B de células grandes difuso	ATCC ATCC	12,2 8,0
WSU-NHL RL HT	Linfoma B histiocítico Linfoma linfoblástico B Linfoma B mixto difuso	ATCC ATCC ATCC	11,0 1,3 1,8
29SR DB	Linfoma linfoblástico de células grandes Linfoma linfoblástico de células grandes	ATCC ATCC	1,9 1,4
MHH-PREB-1 U-698-M SU-DHL-4	Linfoma linfoblástico B Linfoma linfoblástico B Linfoma B histiocítico difuso	DSMZ DSMZ DSMZ	12,2 3,7 1,1
KMH2 L428	Enfermedad de Hogdkin Enfermedad de Hogdkin	DSMZ DSMZ	25,0 12,9
CESS IM-9	Línea celular linfoblastoide B Línea celular linfoblastoide B	ATCC ATCC	20,7 14,8
Jurkat	Leucemia T aguda	ATCC	1,1

* Proporción entre las intensidades de fluorescencia logarítmicas medias para la unión anti-CD70 y la unión de IgG de control.

Figura 5

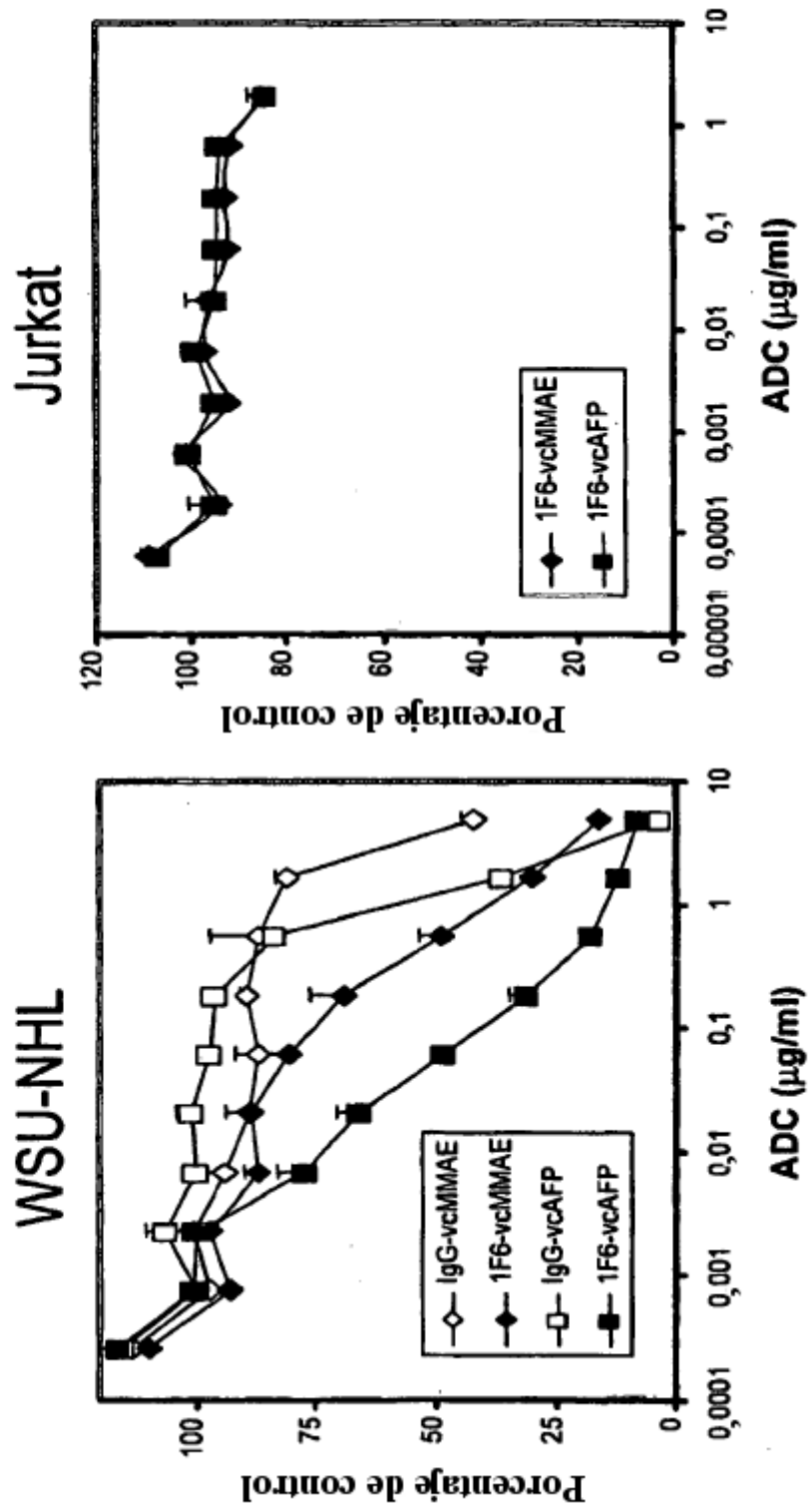


Figura 5 (continuación)

		IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	
		1F6-vcMMAE	1F6-vcAFP
CA46 Ramos	Linfoma de Burkitt americano	>2	1,4
	Linfoma de Burkitt americano	1,6	>2
DAUDI HS Sultan Raji	Linfoma de Burkitt africano	1,8	0,5
	Linfoma de Burkitt africano	>2	0,37
	Linfoma de Burkitt africano	1,8	>2
MC116 Toledo WSU-NHL	Linfoma B indiferenciado	0,06	0,009
	Linfoma B de células grandes difuso	>5	>5
	Linfoma B histiocítico	0,7	0,09
KMH2 L428	Enfermedad de Hogdkin	0,09	0,008
	Enfermedad de Hogdkin	>2	0,045
CESS	Línea celular linfoblastoide B	0,017	0,01
Jurkat	T	>2	>2

Figura 6

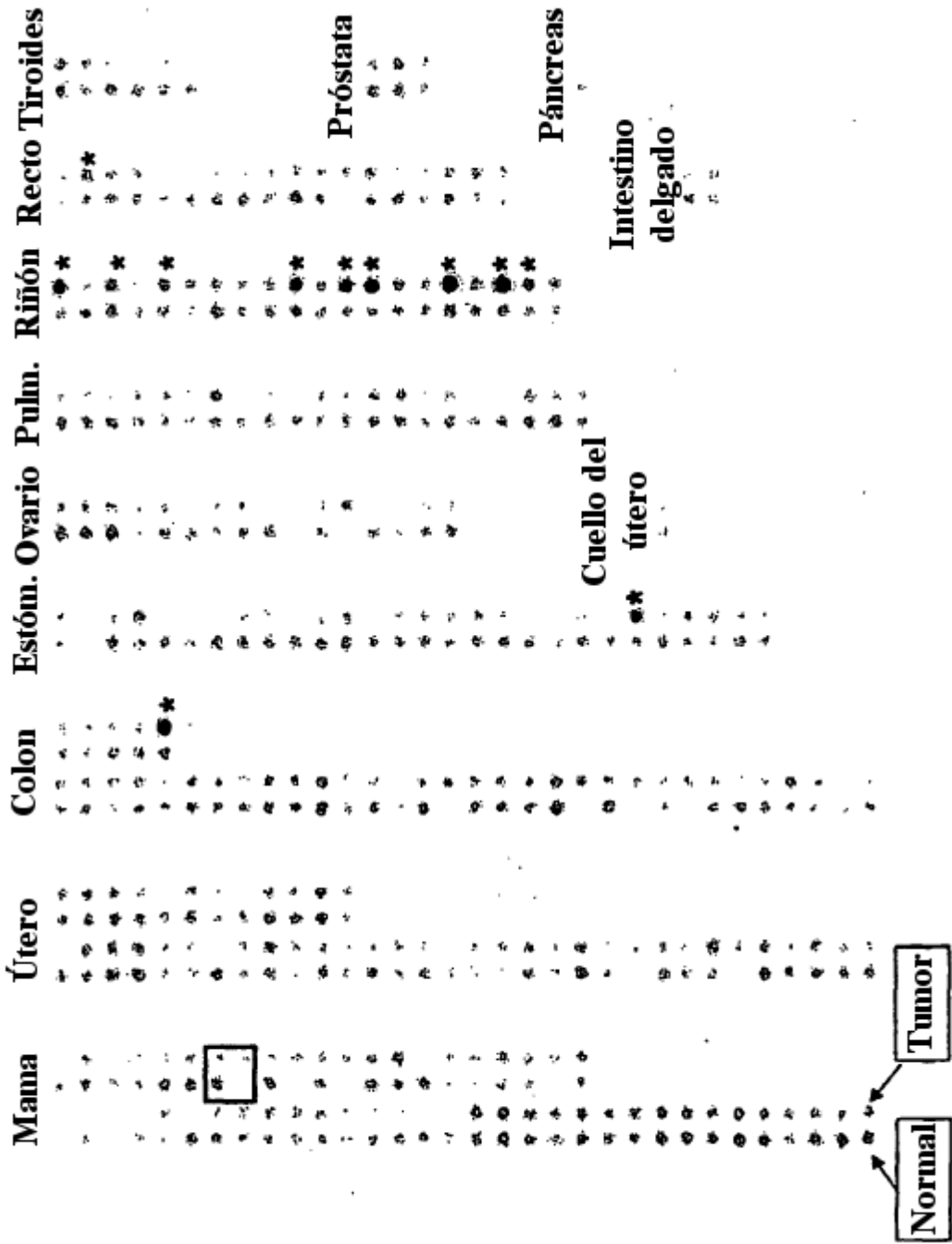
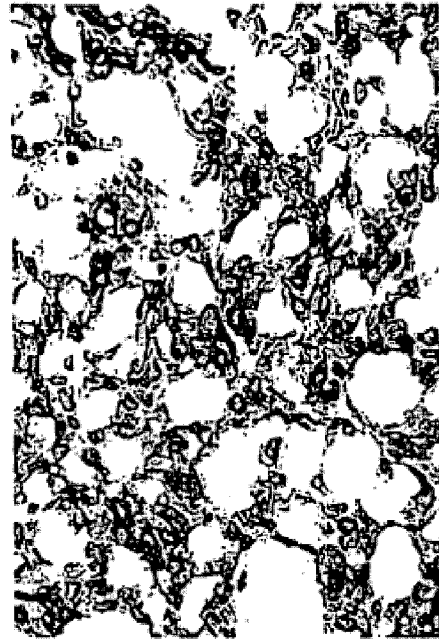


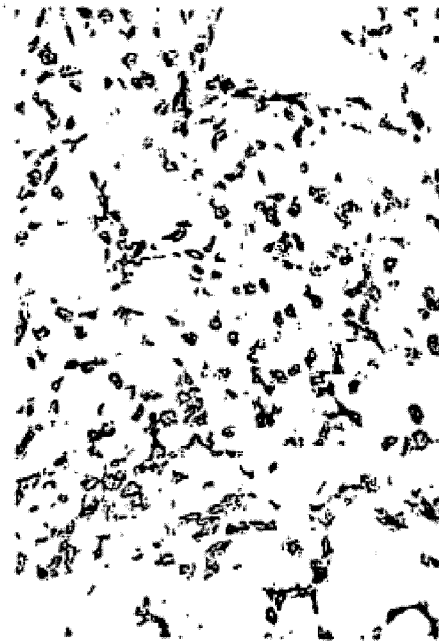
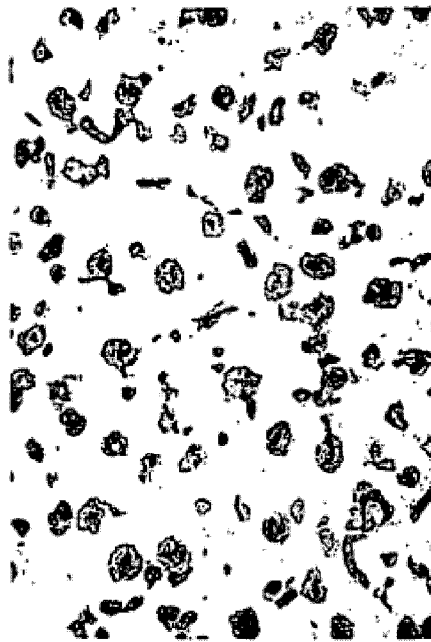
Figura 7

				CD70
RCC211	Adenocarc. de células claras	67	M	2,6
RCC213	Adenocarc. de células claras	74	M	133,8
RCC214	Adenocarc. de células claras	34	M	92,7
RCC215	Adenocarc. de células claras	47	M	1,7
RCC216	Carcinoma de células renales	57	M	13,9
RCC226	Carcinoma de células renales	85	F	0,8
RCC227	Carcinoma de células renales	62	F	4,0
Rcc306	Carcinoma de células renales	49	F	26,0

Figura 8A



2F2, 40X



IgG, 40X

RCC007

RCC064

Figura 8B

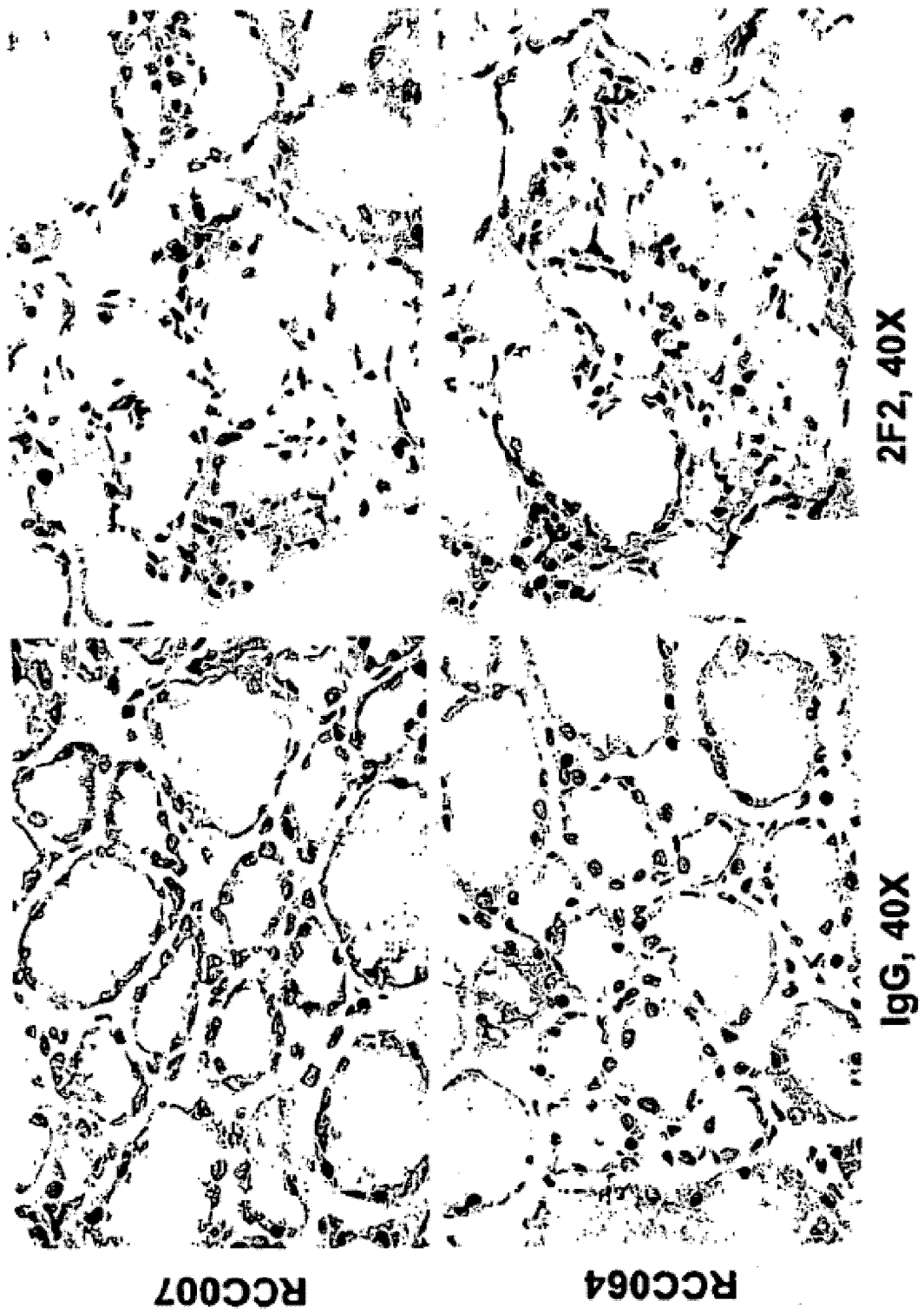
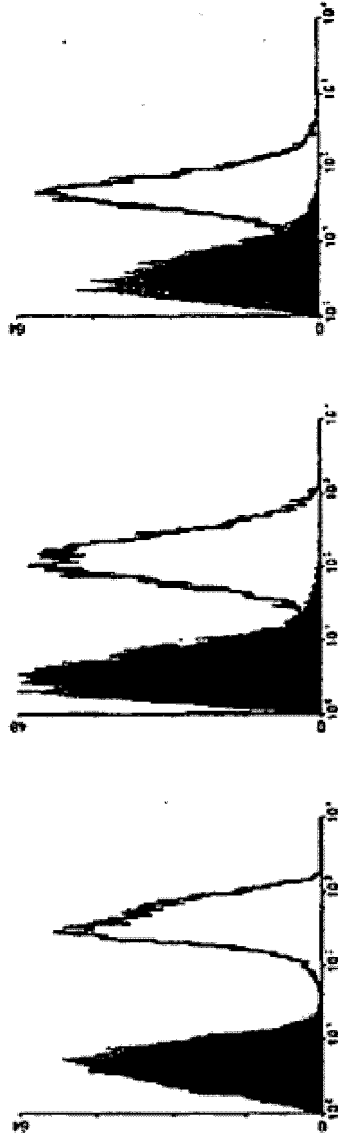


Figura 9A

786-O

Caki-1

Caki-2



Hs835.T

RPTEC

HRCE

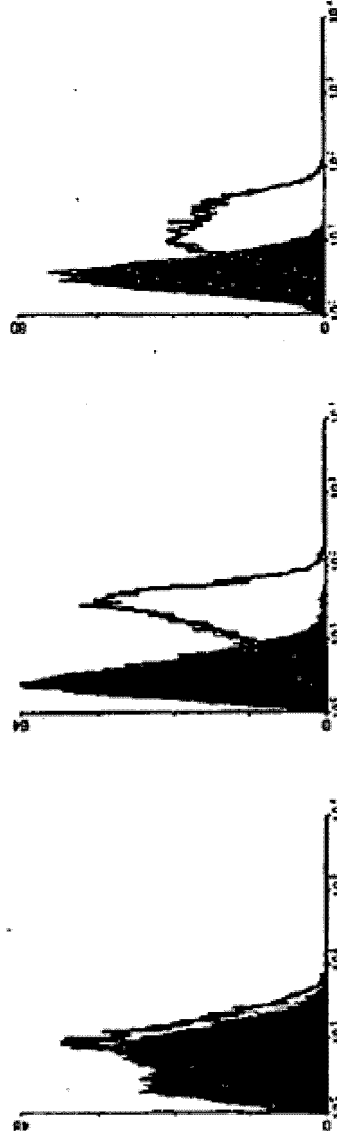


Figura 9B

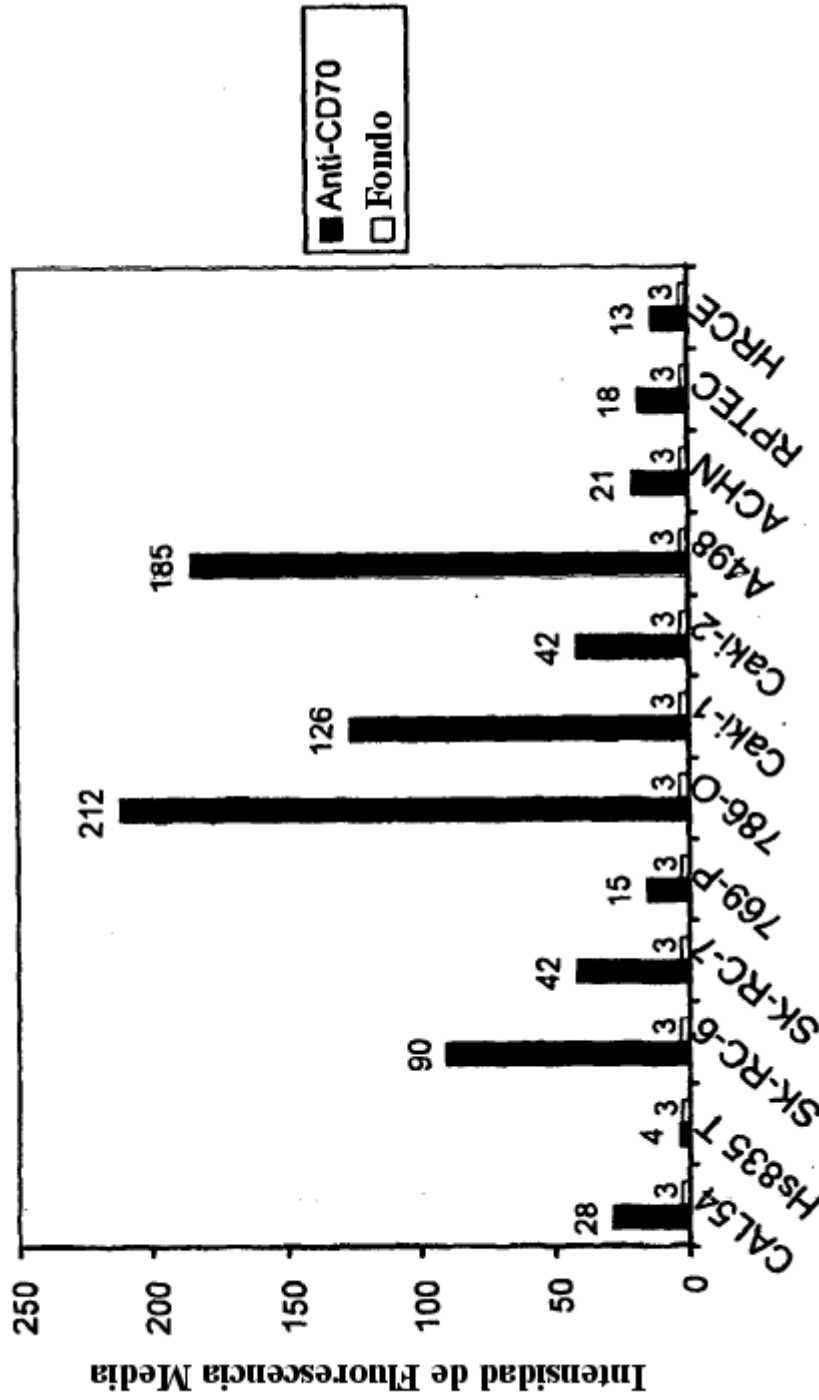


Figura 10

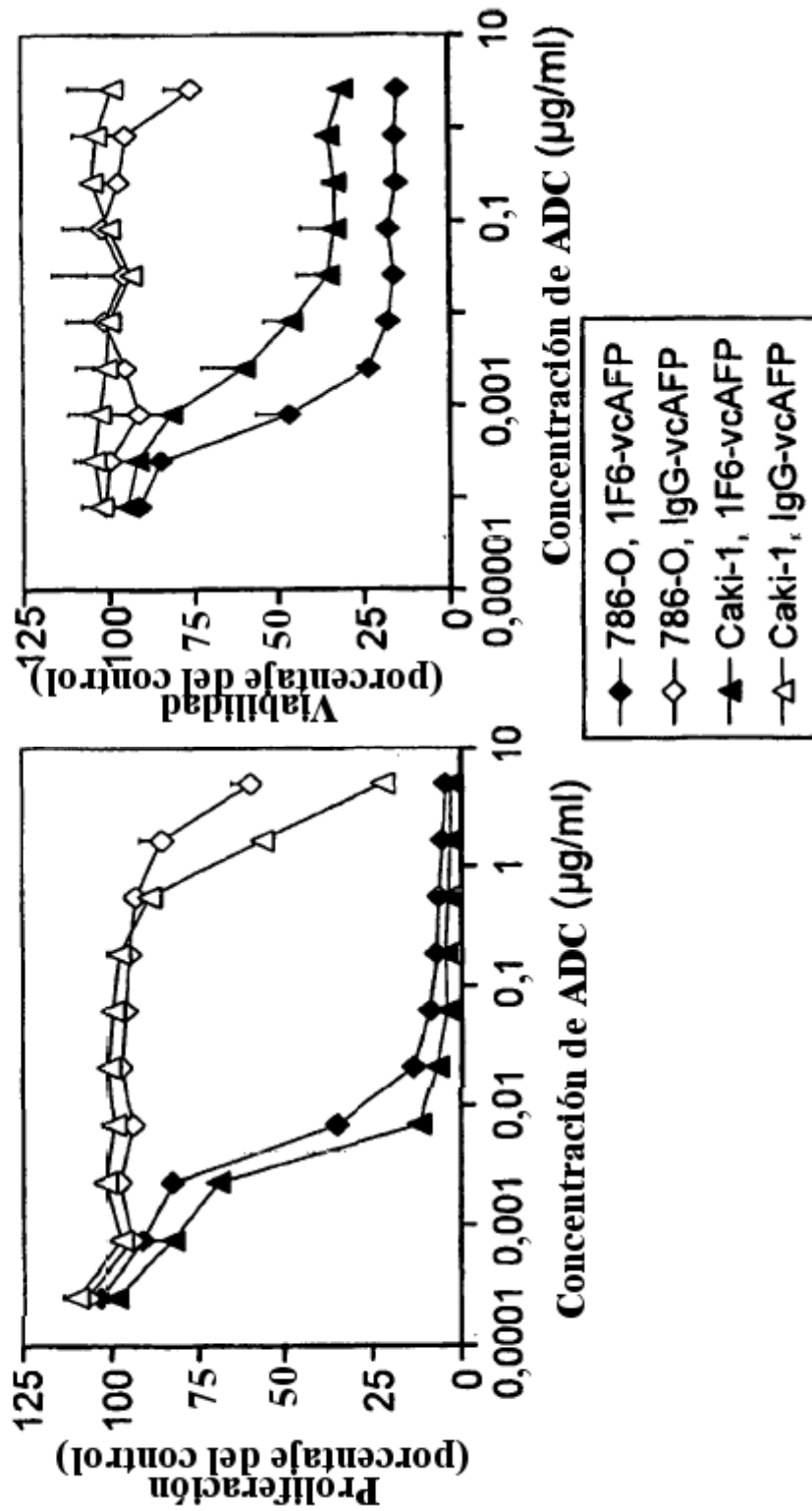


Figura 11

	Inhibición de la proliferación (CI50, ng/ml)					Citotoxicidad (CI50, ng/ml)		
	1F6-vcMMAE	1F6-vcMMAF	1F6-vcAFP	IgG-vcMMAE	IgG-vcAFP	1F6-vcMMAE	1F6-vcMMAF	1F6-vcAFP
Caki-1	16	6	9	5000	>2000	24	14	
Caki-2	10	1	2	4000	1150	3	3	
786-O	>5000	6	9	>5000	>5000	12	15	
769-P	2833	21	152	>5000	250	311	1238	
SK-RC-6	>5000	ND	12	ND	ND	ND	ND	
SK-RC-7	>5000	ND	73	>5000	>5000	ND	ND	
ACHN	>5000	28	247	>5000	>5000	696	800	
CAL54	>5000	11	17	ND	ND	21	240	
A498	>5000	2	5	ND	ND	2	2	
Hs 835.T	3833	ND	1167	1500	1250	ND	ND	
RPTEC	1325	ND	325	ND	ND	>10000	>10000	
HRCE	>5000	ND	1150	ND	ND	>10000	>10000	

Figura 12

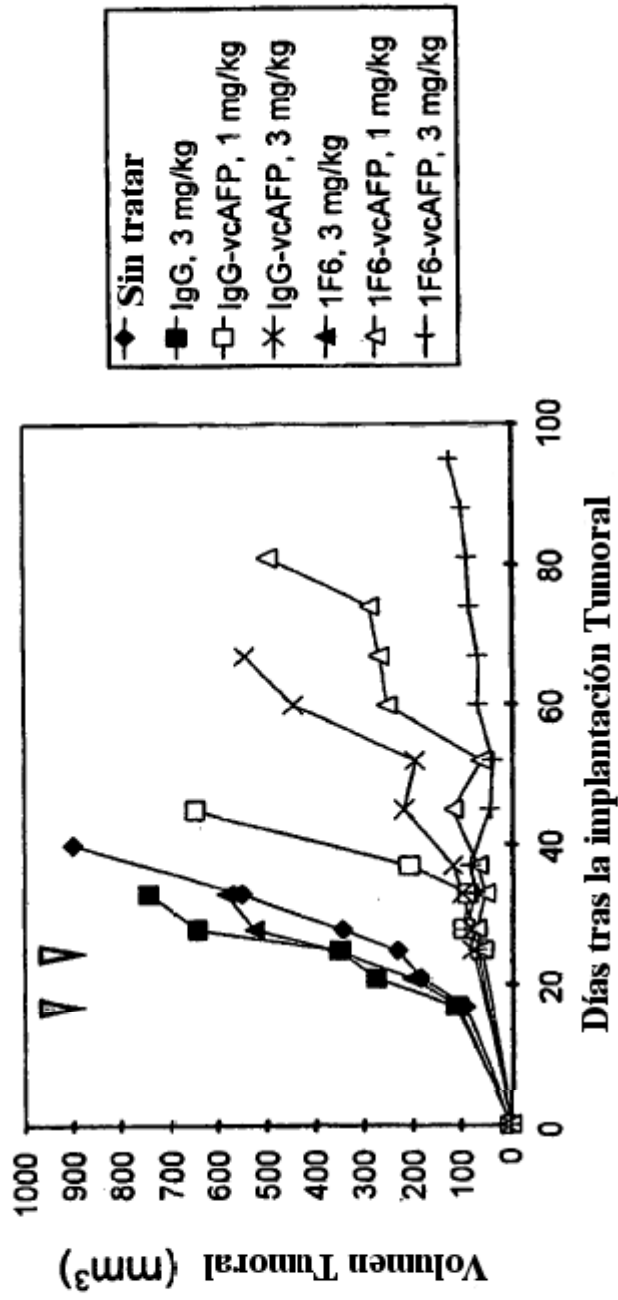


Figura 12 (continuación)

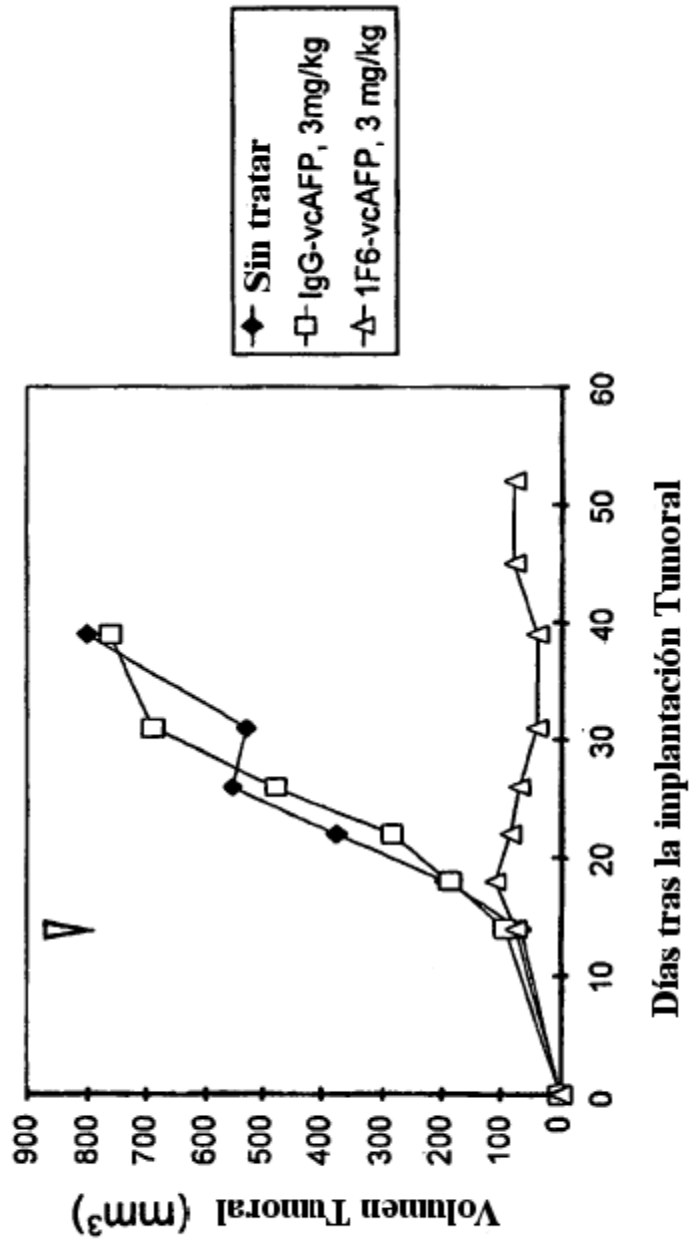


Figura 13

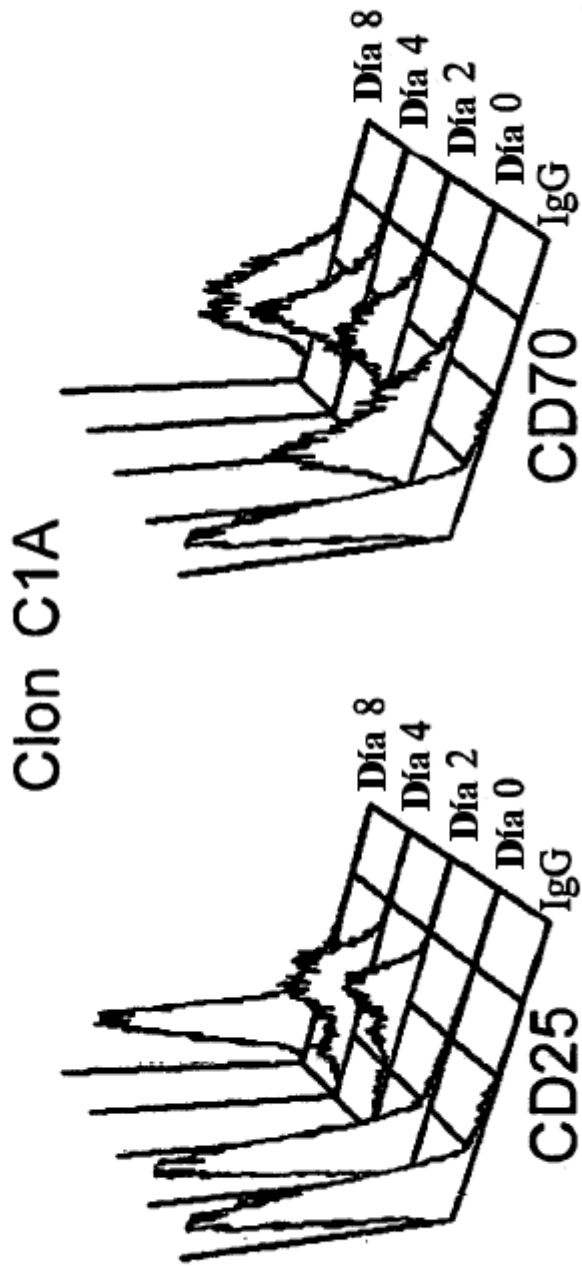


Figura 14

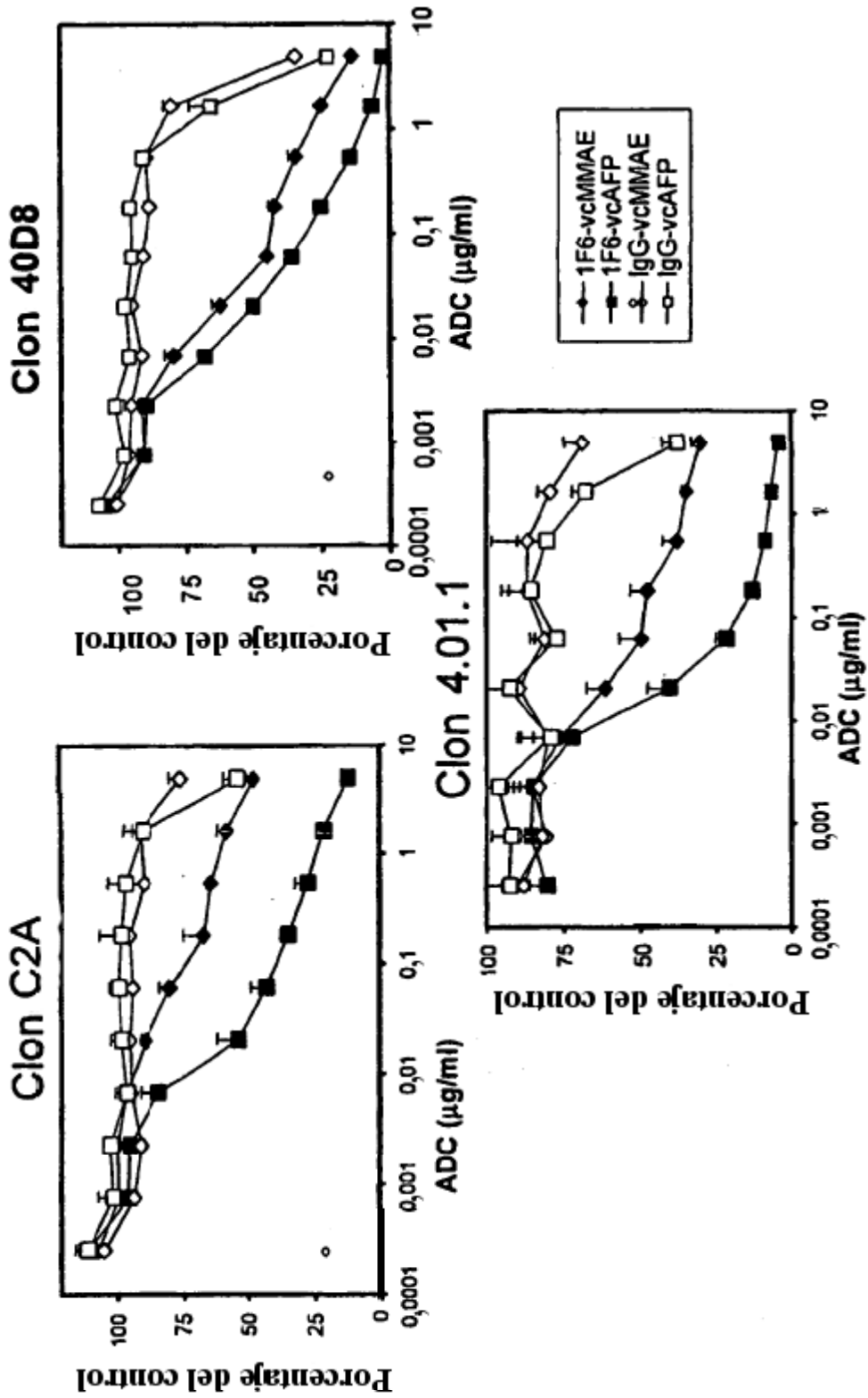


Figura 15

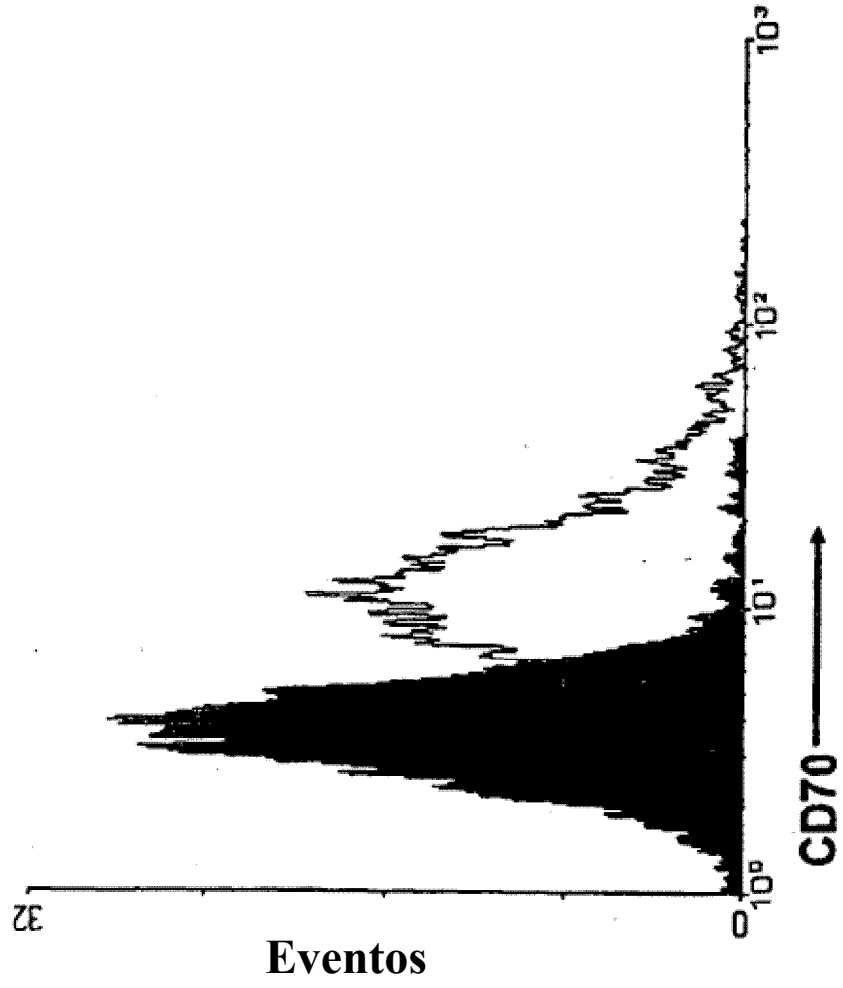


Figura 15 (continuación)

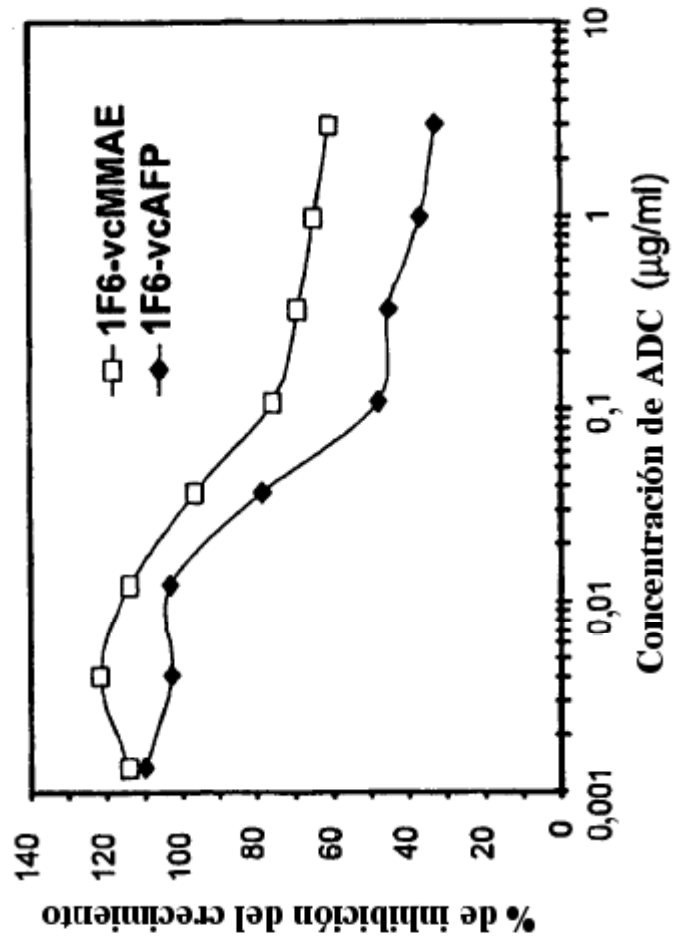


Figura 16

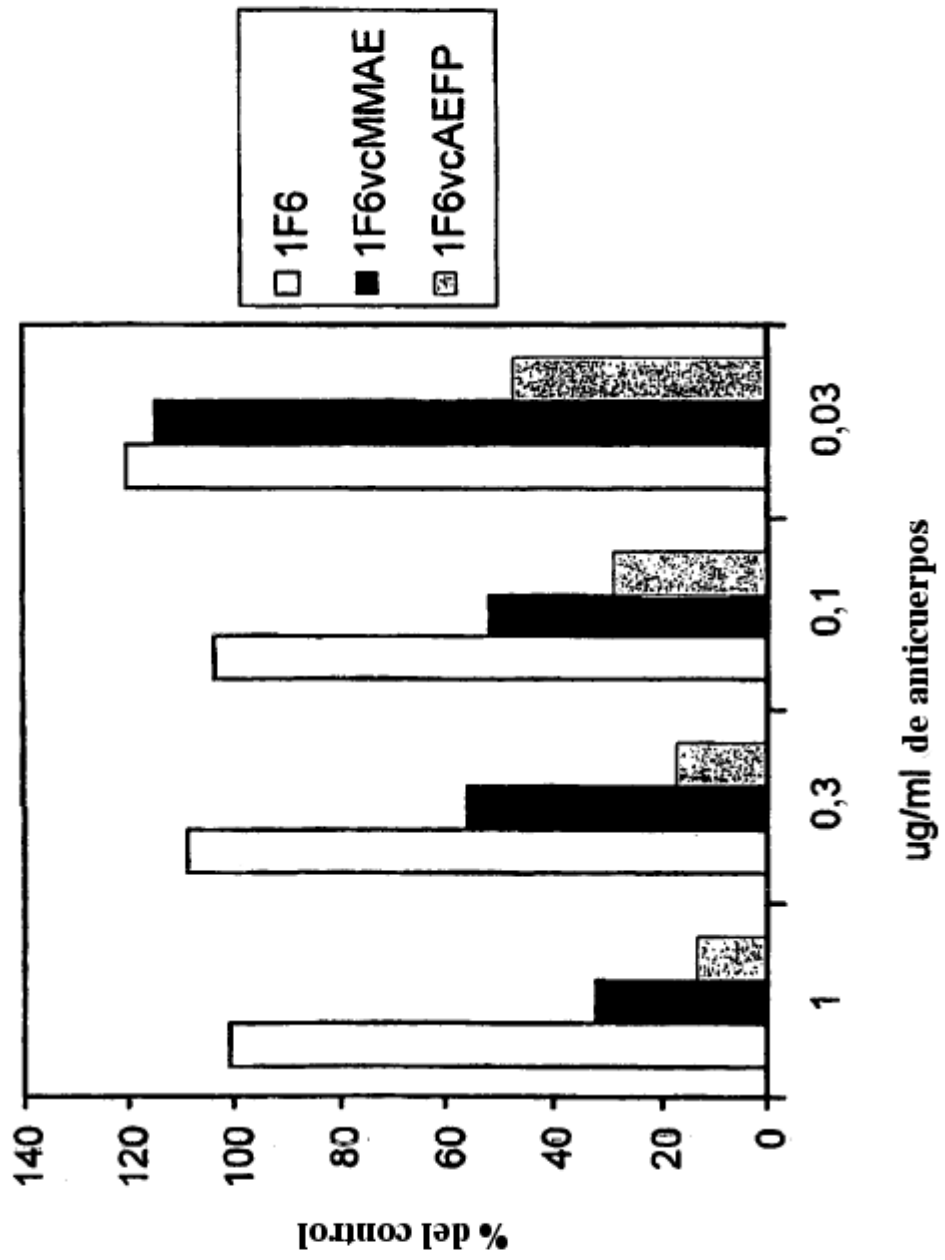


Figura 17

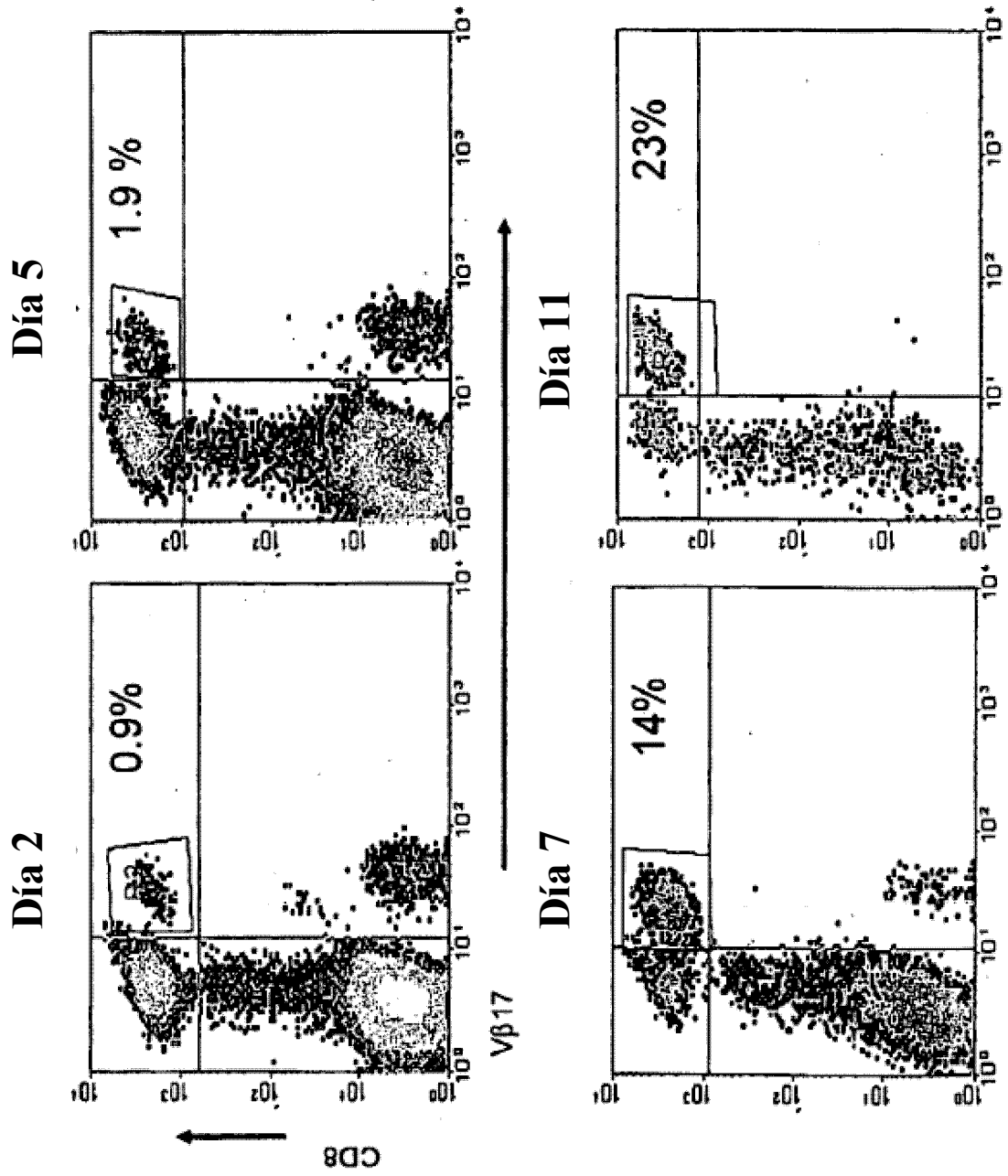


Figura 17 (continuación)

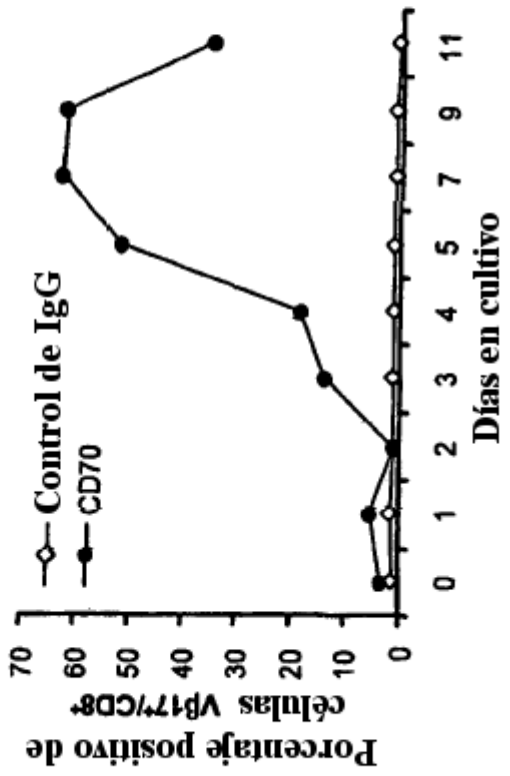
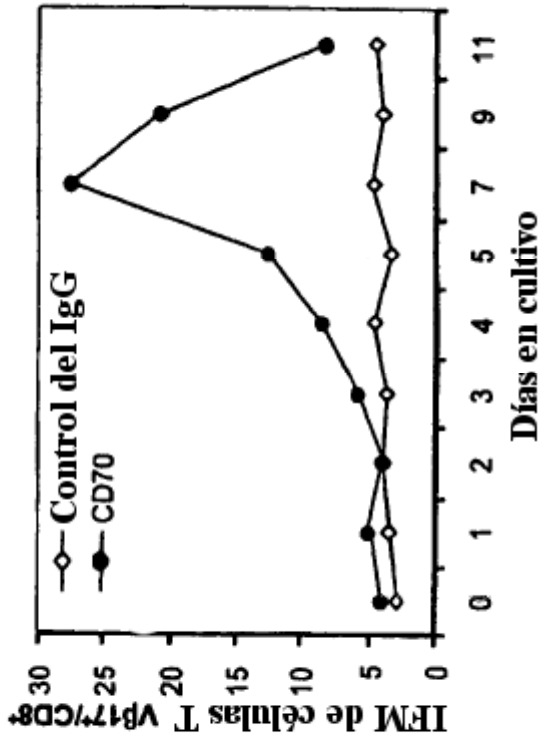
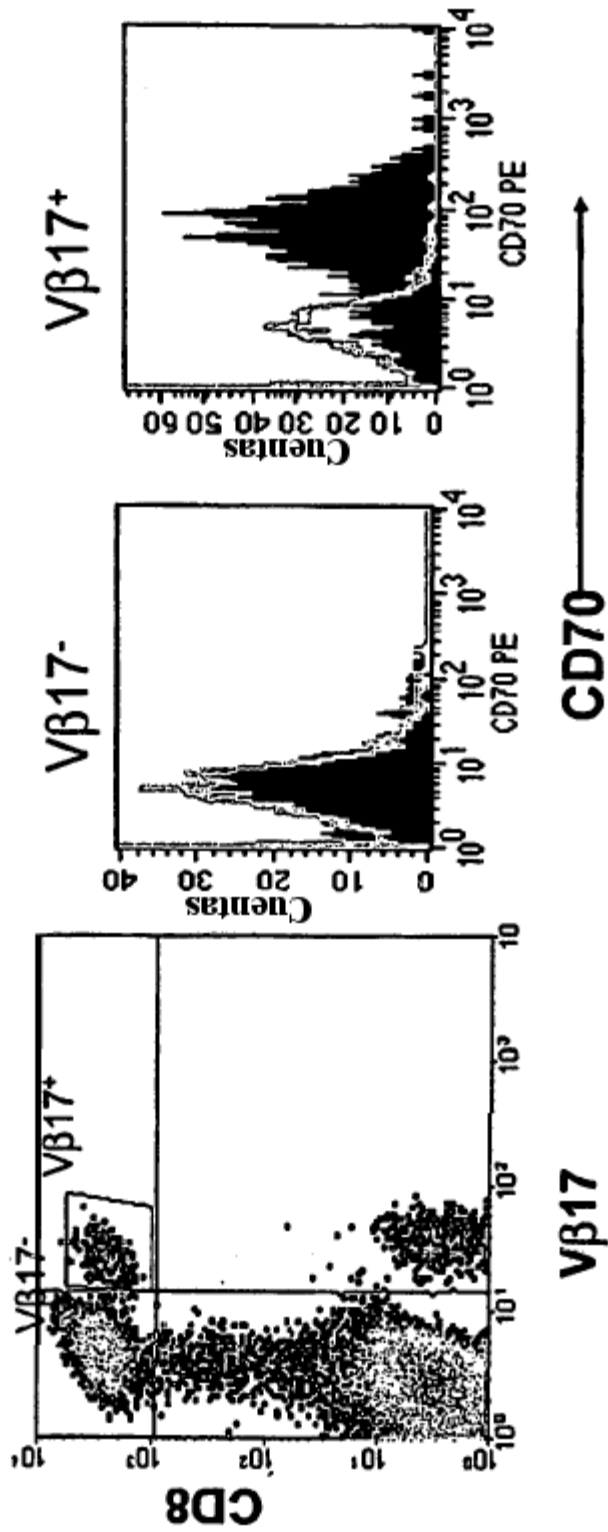
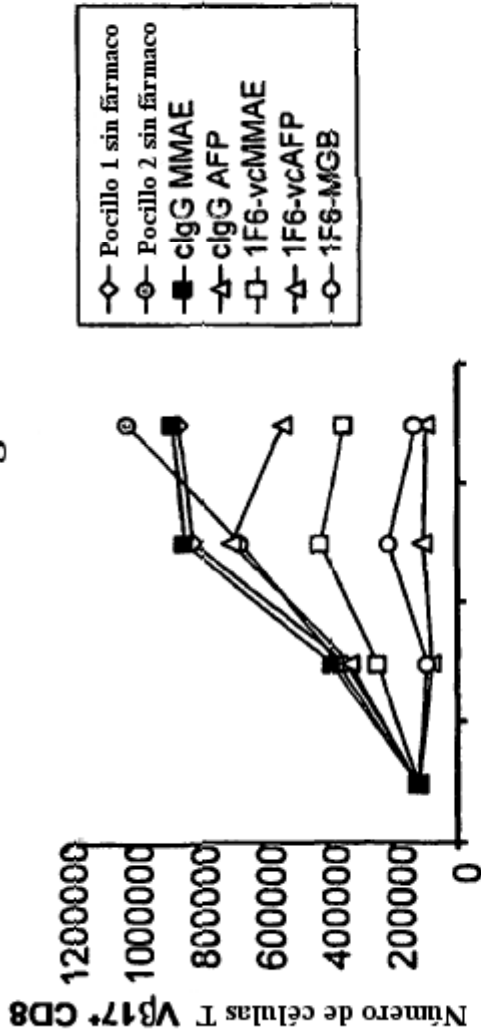


Figura 17B



Día 5 tras el inicio del cultivo

Figura 18



Se añadieron ADCs en el día 5 tras la estimulación con péptido M1



Figura 19

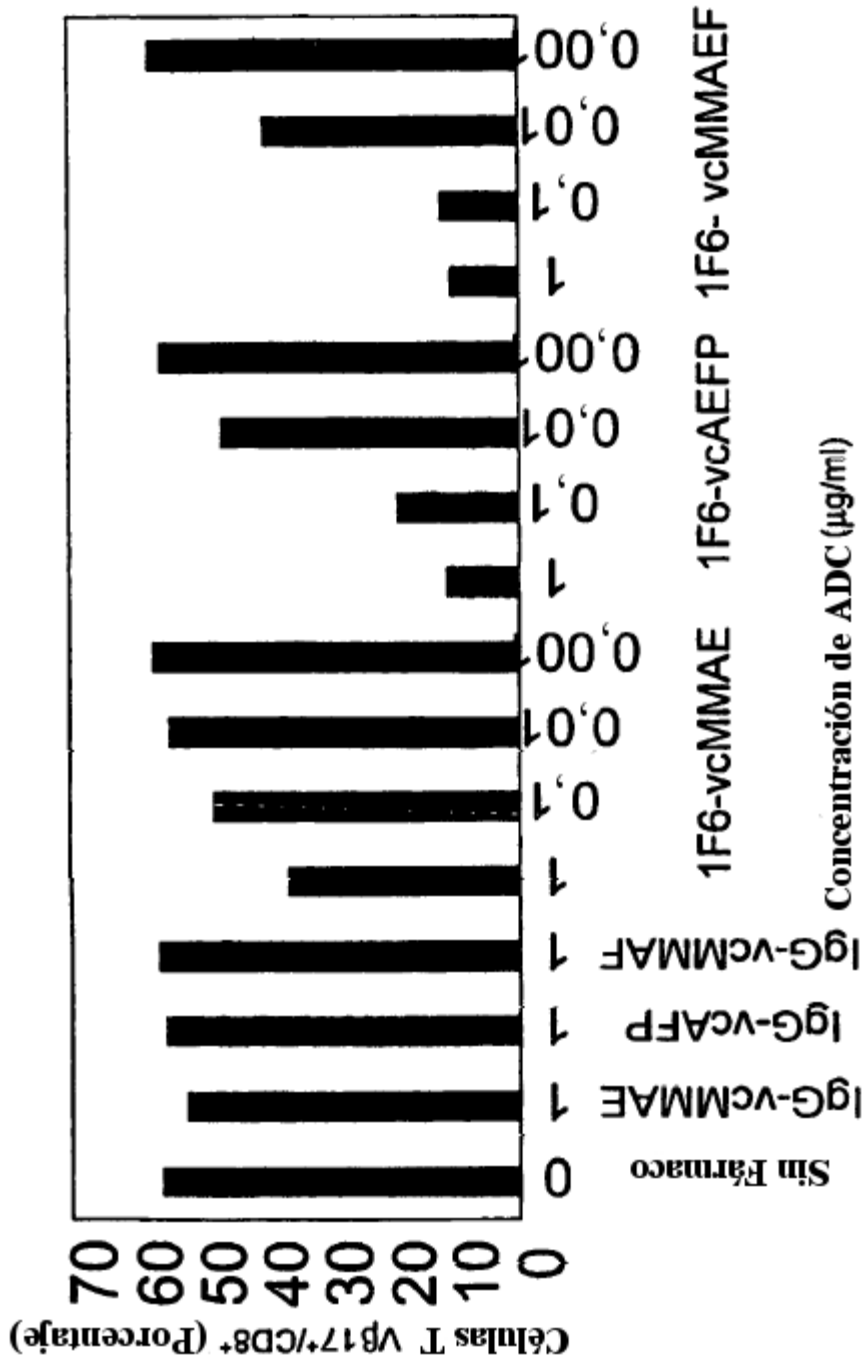


Figura 20

