

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 765**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2006 E 06751010 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 1871418**

54 Título: **Agentes de unión al anti-cd70 humanizado y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.04.2005 US 673070 P

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

17.07.2014

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30TH DRIVE, S.E.
BOTHELL, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**MCDONAGH, CHARLOTTE;
CARTER, PAUL;
MCEARCHERN, JULIE y
LAW, CHE-LEUNG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 477 765 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

Agentes de unión al anti-cd70 humanizado y usos de los mismos

Solicitudes relacionadas

5 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense nº. 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005.

Antecedentes

10 [0002] La CD70 es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) de moléculas asociadas a membranas celulares y secretadas que son expresadas por una variedad de tipos de células normales y malignas. La secuencia primaria de aminoácidos (AA) de la CD70 predice una proteína transmembrana de tipo II con su extremo carboxilo expuesto en el 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). La CD70 humana está compuesta de un dominio citoplasmático 20 AA, un dominio transmembrana 18 AA, y un dominio extracitoplasmático 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 la 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). En base a su homología respecto de TNF-alfa y TNF-beta, en especial en las cadenas estructurales C, D, H e I, se predice una estructura trimérica para la CD70 (Petsch et al., 1995, Mol Immunol. 32:761-72).

20 [0003] Los estudios inmunohistológicos originales revelaron que la 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 de que la 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 linfóide, las células asesinas naturales activadas (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 la CD70. En los linajes no linfoides, se ha detectado la 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).

30 [0004] La CD70 no se expresa en células normales no hematopoyéticas. La expresión de la CD70 se limita en gran parte a las células T y B recién activadas por el antígeno bajo condiciones fisiológicas y su expresión se regula de forma descendente cuando cesa la estimulación antigénica. Existen pruebas provenientes de modelos animales que sugieren que la CD70 puede contribuir a trastornos inmunológicos tales como, por ej., artritis reumatoide (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104), artritis psoriásica (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104) y lupus (Oelke et al., 2004, Arthritis Rheum. 50:1850-60). Además de su posible papel en las respuestas inflamatorias, la CD70 también se expresa en una diversidad de células transformadas incluyendo las células de linfoma B, células de Hodgkin y de Reed-Sternberg, células malignas de origen neural y una serie de carcinomas.

40 [0005] Según esto, existe la necesidad de anticuerpos anti-CD70 y de otros agentes de unión a la CD70 capaces de ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador clínicamente útil sobre las células que expresan la CD70 y, sobre todo, que no ejerzan efectos no deseados sobre las células que no expresan la CD70. Tales compuestos serían agentes terapéuticos útiles contra los cánceres que expresan la CD70 o contra trastornos inmunológicos mediados por células que expresan la CD70. (La recitación de cualquier referencia en la presente solicitud no es una admisión de que la referencia sea una técnica anterior a la presente solicitud).

Breve resumen

45 [0006] La presente invención, según las reivindicaciones, proporciona anticuerpos contra la CD70 y agentes de unión a la CD70 relacionados y tales agentes de unión para su uso en la profilaxis o tratamiento de cánceres que expresan la CD70 y de trastornos inmunológicos en los que hay una presencia de células que expresan la CD70. El agente de unión a la CD70, por sí solo o en combinación con un agente terapéutico, ejerce un efecto citotóxico, citostático y/o inmunomodulador sobre células que expresan la CD70.

50 [0007] En un aspecto, se proporcionan agentes que se unen a la CD70 según las reivindicaciones. El agente de unión a la CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de unión incluye al menos un dominio efector que media al menos una respuesta ADCC, ADCP o CDC en el sujeto. En algunas realizaciones, el agente de unión ejerce un efecto citostático, citotóxico o inmunomodulador en ausencia de conjugación con un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente de unión se conjuga con un agente

terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador. El anticuerpo puede competir por unirse a la CD70 con un anticuerpo monoclonal 1F6 ó 2F2.

5 [0008] En otro aspecto, se proporcionan anticuerpos contra la CD70 y agentes que se unen a la CD70 relacionados conforme a las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa la CD70 en un sujeto. El uso generalmente incluye administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente de unión a la CD70. En algunas realizaciones, el agente de unión incluye al menos un dominio efector que media al menos una respuesta ADCC, ADCP o CDC en el sujeto. En algunas realizaciones, el agente de unión ejerce un efecto citostático, citotóxico o inmunomodulador en ausencia de conjugación con un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente de unión se conjuga con un agente terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador.

10 [0009] El agente de unión a la CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. El anticuerpo puede incluir, por ejemplo, un dominio efector de un anticuerpo IgM o IgG humano. El anticuerpo IgG puede ser, por ejemplo, un subtipo IgG1 o IgG3 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una región constante humana. En algunas realizaciones, el agente de unión a la CD70 compite por unirse a la CD70 con un anticuerpo monoclonal 1F6 ó 2F2. En otras realizaciones, el anticuerpo es un 1F6 humanizado. En otras realizaciones, el anticuerpo es un 2F2 humanizado. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, monovalente, divalente o multivalente.

15 [0010] El cáncer que expresa la CD70 puede ser un tumor renal, un linfoma de células B, un carcinoma de colon, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células de manto, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, un carcinoma nasofaríngeo, tumor cerebral o un carcinoma tímico. El tumor renal puede ser, por ejemplo, un carcinoma de células renales. El tumor cerebral puede ser, por ejemplo, un glioma, un glioblastoma, un astrocitoma o un meningioma. El sujeto puede ser, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano.

20 [0011] En otro aspecto, se proporcionan anticuerpos contra la CD70 y agentes que se unen a la CD70 relacionados conforme a las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno inmunológico. El uso incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un agente de unión a la CD70. En algunas realizaciones, el agente de unión incluye al menos un dominio efector que media al menos una respuesta ADCC, ADCP o CDC en el sujeto. En algunas realizaciones, el agente de unión ejerce un efecto citostático, citotóxico o inmunomodulador en ausencia de conjugación con un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente de unión se conjuga con un agente terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador. El agente de unión a la CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. El anticuerpo puede incluir, por ejemplo, un dominio efector de un anticuerpo IgM o IgG humano. El anticuerpo IgG puede ser, por ejemplo, un subtipo IgG1 o IgG3 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una región constante humana.

25 [0012] El trastorno inmunológico puede ser, por ejemplo, un trastorno inmunológico mediado por células T. En algunas realizaciones, el trastorno inmunológico mediado por células T comprende células T activadas que expresan la CD70. En algunas realizaciones, las células T en reposo no se agotan sustancialmente con la administración del conjugado anticuerpo-fármaco. El trastorno inmunológico mediado por células T también puede ser, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes tipo 1, asma, dermatitis atrópica, rinitis alérgica, púrpura trombocitopénica, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis o enfermedad de injerto contra huésped. En otras realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno por linfocitos B activados. El sujeto puede ser, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano.

30 [0013] En un aspecto relacionado, también se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa la CD70 o de un trastorno inmunológico. La composición incluye un agente de unión a la CD70 y al menos un ingrediente farmacéuticamente compatible. En la divulgación también se proporciona un kit farmacéutico con un recipiente que incluye un agente de unión a la CD70, en el cual se liofiliza el agente, y un segundo recipiente que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 [0014] La presente invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, a los ejemplos no limitativos de las realizaciones específicas de la invención y a las figuras y la lista de secuencias adjuntas.

50 **Breve descripción de los dibujos**

[0015] La Figura 1 es un alineamiento de las variantes humanizadas V_H del 1F6 humanizado $hV_{H,E}$ y $hV_{H,J}$ con la mV_H del 1F6 y los exones $V_{H,1-2}$ de la V_H y el exón JH6 de la J_H de la línea germinal humana. En el alineamiento, < - > indica que el aminoácido es idéntico al residuo murino. El residuo de lisina resaltado (K) en la H46 de la $hV_{H,J}$ indica una retromutación al residuo murino. Los residuos de aminoácidos subrayados indican las posiciones en la

CDR1 y en la CDR2 conforme a la definición de Kabat, mientras que los residuos dentro de los recuadros indican las posiciones en la CDR correspondiente identificadas por la definición de Chothia. < ^ >, como en las posiciones 37, 39, 45, 47, 95 y 97, indica que hay un residuo involucrado en la interfaz V_H/V_L.

5 [0016] La Figura 2 es un alineamiento de las variantes humanizadas V_H del 1F6 humanizado hV_HH y hV_HM con la mV_H del 1F6 y los exones V_H1-18 de la V_H y el exón JH6 de la J_H de la línea germinal humana. En el alineamiento, < • > indica que el aminoácido es idéntico al residuo murino. Los residuos resaltados en H46, H67, H68, H69, H70 y H71 de la hV_HM indican retromutaciones en los residuos murinos. De forma análoga, los residuos resaltados en las posiciones H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82 y H82A de la hV_HM indican retromutaciones en los residuos murinos. Los residuos de aminoácidos subrayados indican las posiciones en las CDR1, CDR2 y CDR3 conforme a la definición de Kabat, mientras que los residuos dentro de los recuadros indican las posiciones en la CDR correspondiente identificadas por la definición de Chothia. < ^ >, como en las posiciones 37, 39, 45, 47, 98 y 100, indica que hay un residuo involucrado en la interfaz V_H/V_L.

15 [0017] La Figura 3 es un alineamiento de la variante V_L del 1F6 humanizado hV_LA con la mV_L del 1F6 y el exón B3 de la V_k y el exón JK-1 de la J_k de la línea germinal humana. En el alineamiento, < * > indica que el aminoácido es idéntico al residuo murino. Los residuos de aminoácidos subrayados indican las posiciones en las CDR1, CDR2 y CDR3 conforme a la definición de Kabat, mientras que los residuos dentro de los recuadros indican las posiciones en la CDR correspondiente identificadas por la definición de Chothia. < ^ >, como en las posiciones 42, 44, 50, 52 y 93, indica que hay un residuo involucrado en la interfaz V_H/V_L.

20 [0018] Las Figuras 4A y 4B muestran que los anticuerpos anti-CD70 1F6 humanizados median una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células diana marcadas con Na₂⁵¹CrO₄ (células linfoblastoides B WIL2-S, células de carcinoma de células renales 786-O y células de carcinoma de células renales 769-P) se revistieron de anticuerpo y se incubaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) según una relación de efector a diana de 10 células CD16⁺ (receptor FcγIII) a 1 célula diana. Pasadas 4 horas se midieron los sobrenadantes de las células lisadas en un contador de centelleo. El porcentaje de lisis específica se calculó según la fórmula {(cpm de la muestra de ensayo – cpm espontánea) / (cpm total – cpm espontánea)} X 100. Los puntos representan la media +/- la desviación estándar de tres muestras. En la Figura 4A se muestra la actividad ADCC mediada por las variantes HHLA, HJLA y HELA del 1F6 humanizado en comparación con el MgG₁ de control del anticuerpo no aglutinante y el anticuerpo 1F6 murino. En la Figura 4B se muestra una lisis dirigida a anticuerpos de líneas celulares de carcinomas de células renales mediada por un 1F6 quimérico y la variante HJLA del 1F6 humanizado, y MgG₁.

35 [0019] La Figura 5 muestra que la variante anti-CD70 HJLA del 1F6 humanizado media una citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC). Las células diana LP-1, MHH PreB-1 y WIL-S se mezclaron con un 1F6 quimérico, un 1F6 humanizado (HJLA) o una Ig humana no aglutinante en presencia de suero humano como fuente de complemento. Después de 2 horas a 37 °C, se añadió yoduro de propidio para determinar la viabilidad celular medida a través de citometría de flujo, y se calculó la cantidad de actividad lítica. Las barras representan la media +/- la desviación estándar de tres muestras.

40 [0020] La Figura 6 muestra que los anticuerpos anti-CD70 1F6 humanizados median la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Se marcaron células diana de carcinomas de células renales 786-O CD70⁺ con colorante de membranas celulares rojo fluorescente (PKH26, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) y, a continuación se revistieron con 1F6 quimérico, 1F6 humanizado (HJLA) o Ig humana no aglutinante durante 30 minutos en hielo. Las células diana marcadas, tratadas con anticuerpo se mezclaron con macrófagos derivados de monocitos según una relación de 1 macrófago por 4 células diana durante 1 hora a 37 °C. Los macrófagos se tiñeron con un anticuerpo anti-CD11b Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y se determinó el porcentaje de actividad fagocítica según el porcentaje de macrófagos que presentaban fluorescencia doble al ser analizados por citometría de flujo.

50 [0021] La Figura 7 muestra que el anticuerpo anti-CD70 1F6 humanizado prolonga la supervivencia de ratones en modelos xenógrafos de linfoma diseminado y mieloma múltiple. (A) Supervivencia de ratones inyectados con células Raji y tratados con un anticuerpo 1F6 humanizado o anticuerpo de control no aglutinante. El tratamiento se inició un día después de la inyección de las células tumorales y se administró mediante inyección intraperitoneal cada cuatro días durante un total de seis dosis (n = 10 por grupo). (B, C, paneles de la izquierda) Supervivencia de los ratones inyectados con células L363 o MM.1S y tratados con 1F6 humanizado desde el día siguiente al implante celular. El anticuerpo se administró por inyección intravenosa una vez a la semana durante un total de cinco dosis. A los ratones se les supervisó dos veces a la semana y fueron sacrificados al manifestarse la enfermedad (n = 7 por grupo). (B, C, paneles de la derecha) Análisis de las concentraciones de cadena ligera λ en los sueros recogidos de los ratones inyectados con células L363 o MM.1S. Se tomaron muestras a los 35 y 42 días de la inyección tumoral, respectivamente. En todos los estudios, los valores p ofrecidos se encuentran entre los grupos tratados con 1F6 humanizado y el grupo no tratado.

- 5 [0022] La Figura 8 muestra que el 1F6 humanizado media el agotamiento de las células CD8+Vβ17+ específicas al antígeno. Las PBMC de un donante HLA-A0201 normal se estimularon con el péptido M1. (A) Los cultivos estimulados con el péptido no se trataron o se trataron mediante la adición concurrente de dosis graduadas de anticuerpo 1F6 humanizado, conforme a lo indicado anteriormente. A los 9 días se determinó el porcentaje de células CD8+Vβ17+ por citometría de flujo. (B) Los cultivos estimulados con péptidos no se trataron o se trataron el día 0 con 1 µg/ml de 1F6 humanizado en ausencia (barras negras) o presencia (barras con rayas) de 10 µg/ml de anticuerpo específico para el FcγRIII (CD 16). A los 9 días se determinó el porcentaje de células CD8+Vβ17+ por citometría de flujo.
- 10 [0023] La Figura 9 muestra el impacto mínimo que ejerce el anticuerpo anti-CD70 1F6 en las células T espectadoras en reposo. Las PBMC de un donante HLA-A0201 normal no se trataron (no estim.) ni estimularon con un péptido M1 (estimulación peptídica) en presencia o ausencia de 1 µg/ml de c1F6. Tras nueve días en cultivo, se analizó la representación de la Vβ del TCR entre las células CD4 y las CD8 de cada grupo por citometría de flujo utilizando el Equipo para el Repertorio Vβ del TCR IOTest® Beta Mark.
- 15 [0024] En la Figura 10 se muestra un modelo xenógrafo de carcinoma de células renales. (A) Se iniciaron tumores 786-0 subcutáneos en ratones desnudos mediante la implantación de fragmentos de tumores (N=5 ó 6/grupo) de 30 mm³ aproximadamente. Se dejó crecer a los tumores y el tratamiento se comenzó cuando el tamaño medio de los tumores de cada grupo llegó a 100 mm³ aproximadamente. Se administró h1F6-mcMMAF4 ó h1F6-vcMMAF4 a las dosis indicadas según un protocolo de 1 dosis cada 4 días de 4 dosis totales (q4d x 4) empezando el día 17 tras la implantación de los tumores, según queda indicado con las flechas. Las rayas transversales indican el momento en que fueron sacrificados los animales con tumores > 1000 mm³. (B) La implantación de tumores 786-O y el inicio del tratamiento fueron los mismos que los indicados en (A). Se administró h1F6-mcMMAF4 o h1F6-vcMMAF4 a grupos de ratones (N=5-7) a razón de 0,17 mg/kg según un protocolo de 1 dosis cada 4 días de 4 dosis totales (q4d x 4) o de 1 dosis cada 4 días de 10 dosis totales (q4d x 10) empezando el día 13 tras la implantación de los tumores. El crecimiento de los tumores queda representado mediante gráficas de Kaplan-Meier. Se registró un evento en el caso de un ratón con un tumor cuyo tamaño se había cuadruplicado en comparación con el día 13 que comenzó el tratamiento. Los ratones con tumores cuyo tamaño no se había cuadruplicado al final del experimento el día 43 fueron apartados. Se utilizó la prueba de rango logarítmico para generar valores p entre los grupos de tratamiento y el grupo sin tratamiento.
- 20 [0025] La Figura 11 muestra un Modelo Xenógrafo de Mieloma Múltiple de ratón. (A) En cada ratón SCID se inyectaron diez millones de células MM-1S por vía intravenosa. Se dejaron grupos de ratones sin tratar (N=8-10) que recibieron IgG-vcMMAF4, IgG-mcMMAF4, h1F6-vcMMAF4 o h1F6- mcMMAF4 a las dosis especificadas según un protocolo de 1 dosis cada 7 días de 5 dosis totales (q7d x 5), según lo indicado con las flechas. Los ratones que mostraron síntomas de parálisis en las extremidades posteriores, postura encorvada, inflamación cerebral y/o pelo andrajoso fueron sacrificados y se hizo una gráfica con el porcentaje de supervivencia de cada grupo. Se utilizó la prueba de rango logarítmico para generar valores p entre los grupos de tratamiento y los grupos de control. (B) Se recuperaron células de la médula ósea de los fémures de los ratones sacrificados debido a los síntomas patológicos antedichos o el día 122 tras la implantación de las células tumorales que finalizó el experimento. Se determinó el porcentaje de células MM-1S que expresan CD138 en los fémures de cada ratón por citometría de flujo. Se utilizó la prueba Mann-Whitney para derivar los valores p entre los grupos indicados.
- 25 [0026] La Figura 12 muestra un Modelo Xenógrafo de Mieloma Múltiple de ratón. (A) En cada ratón SCID se inyectaron diez millones de células L363 por vía intravenosa. Se dejaron grupos de ratones sin tratar (N=7) que recibieron IgG-vcMMAF4 o h1F6-vcMMAF4 a las dosis especificadas según un protocolo de 1 dosis cada 7 días de 5 dosis totales (q7d x 5), según lo indicado con las flechas. A los ratones que mostraron masas tumorales palpables se les sacrificó y se hizo una gráfica con el porcentaje de supervivencia de cada grupo. Se utilizó la prueba de rango logarítmico para generar los valores p entre los grupos con tratamiento y el grupo sin tratamiento. (B) Se obtuvieron muestras de suero de los ratones 40 días después del implante de los tumores. Se determinó la concentración de cadena ligera λ humana en el suero de cada ratón mediante un ensayo ELISA. Se utilizó la prueba Mann-Whitney para derivar los valores p entre los grupos indicados.

Descripción detallada

- 30 [0027] La presente invención, según las reivindicaciones, proporciona agentes que se unen a la CD70 y tales agentes de unión para su uso en la profilaxis o tratamiento de cánceres que expresan la CD70 y de trastornos inmunológicos. El agente de unión a la CD70 se une específicamente a la CD70 (por ej., el dominio extracelular). El agente de unión puede incluir al menos un dominio efector que media una respuesta ADCC, ADCP y/o CDC. El agente de unión puede ejercer un efecto citostático, citotóxico o inmunomodulador en ausencia de conjugación con un agente terapéutico. El agente de unión puede conjugarse con un agente terapéutico capaz de ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador.
- 35
- 40
- 45

[0028] En un aspecto, las composiciones y los usos según las reivindicaciones se refieren a agentes que se unen a la CD70, tales como anticuerpos y derivados de anticuerpos. El anticuerpo anti-CD70 puede ser un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento o derivado del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 incluye una región o dominio constante del anticuerpo. La región o dominio constante del anticuerpo puede ser, por ejemplo, del subtipo IgG. En una realización de ejemplo, el anticuerpo anti-CD70, el fragmento o los derivados del mismo, compiten con el anticuerpo monoclonal murino (mAb) 1F6 ó 2F2 para unirse a la CD70 y comprende secuencias de la región constante del anticuerpo humano. En otra realización de ejemplo, el anticuerpo anti-CD70, o fragmento o derivado del mismo, tiene un dominio efector (por ej., una porción Fc) capaz de interactuar con células efectoras o con un complemento para mediar un efecto citotóxico, citostático y/o inmunomodulador que resulta en el agotamiento o inhibición de la proliferación de células que expresan la CD70. En otra realización de ejemplo, el anticuerpo anti-CD70 carece de función efectora. En otra realización de ejemplo, el anticuerpo anti-CD70 se conjuga con un agente terapéutico.

[0029] En la divulgación también se incluyen equipos y artículos de fabricación que comprenden un agente de unión a la CD70 (por ej., un anticuerpo anti-CD70 humanizado).

[0030] Para 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

[0031] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entendería un experto en la técnica pertinente respecto a los métodos y composiciones descritos. Cuando quiera que en el presente documento se utilicen nombres comerciales, los solicitantes pretenden incluir por separado la formulación del producto de nombre comercial, el fármaco genérico y el o los ingredientes farmacéuticos activos del producto de nombre comercial. Tal como se utilizan en el presente documento, los siguientes términos y frases tienen los significados atribuidos a ellos a menos que se especifique de otra manera.

[0032] Los términos "agente de unión a la CD70" y "agente de unión a un anti-CD70", tal y como se utilizan en el presente documento, significan un anticuerpo anti-CD70, un derivado o un fragmento de un anticuerpo anti-CD70, o cualquier otro agente de unión a la CD70 y que comprende al menos una CDR o región variable de un anticuerpo que se une a la CD70, o un derivado del mismo.

[0033] El término "se une específicamente" significa que el agente de unión reaccionará, de una manera altamente selectiva, con su antígeno correspondiente y no con la multitud de antígenos existentes (por ej., moléculas distintas de la CD70).

[0034] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "funcional" en el contexto de un agente de unión a la CD70 indica que el agente de unión es capaz de unirse a la CD70.

[0035] Los términos "inhibir" o "inhibición de", tal como se utilizan en el presente documento, significan reducir en una cantidad medible, o prevenir completamente.

[0036] El término "agotar" en el contexto del efecto de un agente de unión a la CD70 sobre células que expresan la CD70 se refiere a una reducción del número o eliminación de las células que expresan la CD70.

[0037] "Anticuerpos intactos" e "inmunoglobulinas intactas" se definen en el presente documento como glicoproteínas heterotetraméricas, por lo general de alrededor de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada por un puente de disulfuro para formar un heterodímero. El heterotetrámero está formado por el enlace disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de dichos heterodímeros. Aunque las cadenas ligeras y pesadas están unidas entre sí por un puente disulfuro, el número de enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de inmunoglobulina (Ig). Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro entre las cadenas separadas regularmente. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino-terminal un dominio variable (V_H), seguido de tres o cuatro dominios constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 y/o C_H4), así como una región bisagra (J) entre C_H1 y C_H2 . Cada cadena ligera tiene dos dominios, un dominio variable amino-terminal (V_L) y un dominio constante carboxi-terminal (C_L). El dominio V_L se asocia de forma no covalente al dominio V_H , mientras que el dominio C_L se suele enlazar covalentemente al dominio C_H1 a través de un puente disulfuro. Se cree que los residuos de ciertos aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663).

[0038] El término "hipervariable" se refiere al hecho de que ciertas secuencias dentro de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y contienen residuos que están directamente implicados en la unión y la especificidad de cada anticuerpo en particular por su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, en los dos dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o lazos hipervariables (HVL). Las CDR se definen por comparación de secuencias en Kabat et al., 1991, en: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, M.D., mientras que los HVL se definen estructuralmente dependiendo de la estructura tridimensional del dominio variable, según lo descrito por Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917. Cuando estos dos métodos dan como resultado identificaciones ligeramente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural. Según la definición de Kabat (véase Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5ª ed., Pub. N.º. 91- 3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, M.D., 1991), la CDR-L1 se sitúa aproximadamente en los residuos 24-34, la CDR-L2, en aproximadamente los residuos 50-56, y la CDR-L3, en aproximadamente los residuos 89-97 del dominio variable de las cadenas ligeras; la CDR-H1 en aproximadamente los 31-35, la CDR-H2 en aproximadamente los 50-65 y la CDR-H3 en aproximadamente los 95-102 del dominio variable de la cadena pesada.

[0039] Las tres CDR presentes en cada una de las cadenas pesadas y ligeras están separadas por regiones estructurales (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras, se dispusieron las FR y las CDR en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración esencialmente en lámina β de las FR acerca las CDR de cada una de las cadenas entre sí además de a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye al sitio de unión al antígeno (véase Kabat et al., 1991, NIH Publ. N.º. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669), aunque no todos los residuos de las CDR están directamente involucrados en la unión al antígeno.

[0040] Los residuos de la FR y los dominios constantes de Ig normalmente no están directamente involucrados en la unión al antígeno, pero pueden contribuir en la unión al antígeno o mediar en la función efectora del anticuerpo. Algunos residuos de la FR pueden tener un efecto significativo en la unión al antígeno en al menos tres maneras: por la unión no covalente directamente a un epítipo, por la interacción con uno o más residuos de la CDR, y afectando a la interconexión entre las cadenas ligeras y pesadas. Los dominios constantes median en varias funciones efectoras de la Ig, tales como la participación de los anticuerpos en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

[0041] Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas de vertebrados son asignadas a una de dos clases claramente diferenciadas, kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos del dominio constante. Comparativamente, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de mamíferos son asignadas a una de las cinco clases principales, según la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA se dividen a su vez en subclases (isotipos), por ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas correspondientes a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan $[\alpha]$, $[\delta]$, $[\epsilon]$, $[\gamma]$ y $[\mu]$, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas son conocidas.

[0042] Los términos "anticuerpo", "anticuerpo anti-CD70", "anticuerpo anti-CD70 humanizado" y "anticuerpo anti-CD70 variante humanizado" se utilizan aquí en el sentido más amplio y abarcan específicamente los anticuerpos de longitud completa y nativos, anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ej., los anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos o de unión a anticuerpos de los mismos, tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que presentan una actividad biológica deseada, por ej., de unión a la CD70.

[0043] El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones que ocurren naturalmente que pueden presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un determinante antigénico único, también denominado epítipo. El modificador "monoclonal" es indicativo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos contra el epítipo idéntico y no se interpretará como que necesita la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Los anticuerpos monoclonales pueden hacerse mediante cualquier técnica o metodología conocida en la materia, por ejemplo, el método de hibridoma descrito por primera vez por Köhler et al., 1975, *Nature* 256:495, o métodos de ADN recombinante conocidos en la materia (véase, por ej., la Patente Estadounidense N.º. 4.816.567). En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos, utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628, y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597.

[0044] En cambio, los anticuerpos presentes en una preparación de anticuerpos policlonales son normalmente una población heterogénea de isotipos y/o clases de inmunoglobulinas y también presentan una variedad de especificidad al epítipo.

5 [0045] El término anticuerpo "quimérico", tal como se utiliza en el presente documento, es un tipo de anticuerpo monoclonal en el que una parte de o toda la secuencia de aminoácidos de una o más regiones o dominios de las cadenas pesadas y/o ligeras es idéntica a, homóloga a, o una variante de la secuencia correspondiente de un anticuerpo monoclonal de otra especie o perteneciente a otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia consenso. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando el
10 fragmento del anticuerpo presente la actividad biológica deseada de su anticuerpo de origen, por ejemplo, uniéndose al mismo epítipo (véase, por ej., la Patente Estadounidense N°. 4.816.567; y Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855). Los métodos para la producción de anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. (Véase, por ej., Morrison, 1985. Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; las Patentes Estadounidenses N°. 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397).

15 [0046] Los términos "fragmento de anticuerpo", "fragmento de anticuerpo anti-CD70", "fragmento de anticuerpo anti-CD70 humanizado" y "fragmento de anticuerpo anti-CD70 variante humanizado" se refieren a una porción de un anticuerpo anti-CD70 de longitud completa en el que se mantiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, la unión específica al epítipo de la CD70. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo de cadena sencilla, y otros anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
20 (Véase Holliger y Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136).

[0047] Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" es una variante Fv de cadena sencilla que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde los dominios se encuentran presentes en una cadena polipeptídica sencilla y es capaz de reconocer y unirse al antígeno. El polipéptido scFv contiene opcionalmente un enlazador polipéptido situado entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme una estructura tridimensional necesaria para la unión al antígeno (véase, por ej., Pluckthun, 1994, en The Pharmacology of Monoclonal
25 Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer- Verlag, New York, págs. 269-315).

[0048] El término "diacuerpo" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos que tienen dos sitios de unión al antígeno. Cada fragmento contiene un dominio variable de la cadena pesada (V_H) concatenado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) para formar un polipéptido V_H - V_L o V_L - V_H. Mediante la utilización de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios enlazados V_H-V_L son forzados a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena, creando dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en las Patentes EP 404.097; WO 93/11161; y en Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

[0049] El término "anticuerpo lineal" se refiere a anticuerpos que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1- V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, tal como se describe en Zapata et al., 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

[0050] Un "anticuerpo humanizado" se refiere a una variante de la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina o a un fragmento de la misma que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una cadena polipeptídica de región variable que tiene regiones estructurales que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.
40

[0051] Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. A estos residuos de aminoácidos no humanos se hace referencia en este documento como residuos de "importación", que normalmente se toman de un dominio de anticuerpos de "importación", en particular un dominio variable. Un residuo, secuencia o anticuerpo de importación tiene una afinidad y/o especificidad deseada, u otra actividad biológica de anticuerpo deseable tal y como se menciona en este documento.
45

[0052] En general, el anticuerpo humanizado comprenderá la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, tal como de, por ejemplo, una secuencia consenso o de línea germinal. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de un dominio Fc de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el anticuerpo puede contener tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones C_H1, bisagra (J), C_H2, C_H3 y/o C_H4 de la cadena pesada, según corresponda.
50
55

[0053] El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluidas las IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y de cualquier isotipo, incluidos los IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. La región o dominio constante puede incluir, por ejemplo, un dominio constante de fijación del complemento en el que se desea que el anticuerpo humanizado presente una actividad citotóxica (por ej., IgG₁). En caso de no desearse dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de otra clase (por ej., IgG₂). El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de los dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia normal en la técnica.

[0054] Las regiones FR y CDR del anticuerpo humanizado no tienen por qué corresponder exactamente a las secuencias originales, por ej., pueden alterarse la CDR de importación o la FR consenso mediante sustitución, inserción o supresión de un residuo por lo menos de modo que el residuo de la CDR o FR de ese sitio no se corresponda ni con el anticuerpo consenso ni con el de importación. Tales mutaciones normalmente no serán extensivas. Normalmente, al menos un 75 % de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de la FR y la CDR originales, más frecuentemente al menos el 90 % y con mayor frecuencia todavía del 95 %.

[0055] El término "función o funciones efector(as) del anticuerpo" tal y como se utilizan en el presente documento, se refiere a una función en la que colaboran uno o más dominios Fc de una Ig. Tales funciones pueden ser, por ejemplo, de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos o citotoxicidad dependiente del complemento. Dicha función puede ser efectuada, por ejemplo, mediante la unión de uno o más dominios efectores Fc a un receptor de Fc de una célula inmunitaria con actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de uno más dominios efectores Fc a componentes del sistema del complemento. Normalmente, el o los efectos mediados por las células que se unen a Fc o componentes del complemento resultan en la inhibición y/o agotamiento de la célula dirigida a la CD70. Sin ánimo de verse obligado por ninguna teoría particular, las regiones Fc de los anticuerpos pueden reclutar células que expresan el receptor de Fc (FcR) y yuxtaponerlas a las células diana revestidas de anticuerpo. Las células que expresan el FcR de superficie para las IgG, incluidos los FcγRIII (CD 16), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD64), pueden actuar como células efectoras para la destrucción de las células revestidas de IgG. Tales células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos. La intervención del FcγR por parte de la IgG activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). La ADCC es mediada por las células efectoras CD16⁺ mediante la secreción de proteínas formadoras de poros en la membrana y proteasas, mientras que la fagocitosis es mediada por las células efectoras CD32⁺ y CD64⁺ (véase *Fundamental Immunology*, 4ª ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Capítulos 3, 17 y 30; Uchida et al., 2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop et al., 2001, *Cancer Res.* 61 :4061-65; Watanabe et al., 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207). Además de la ADCC y la ADCP, las regiones Fc de los anticuerpos unidos a células también pueden activar la vía clásica del complemento para suscitar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El C1q del sistema del complemento se une a las regiones Fc de los anticuerpos cuando estos se encuentran complejados con antígenos. La unión del C1q a los anticuerpos unidos a células puede iniciar una cascada de eventos, entre ellos la activación proteolítica de C4 y C2 para generar la convertasa C3. La fragmentación del C3 en C3b por parte de la convertasa de C3 permite la activación de los componentes terminales del complemento incluidos los C5b, C6, C7, C8 y C9. Colectivamente, estas proteínas forman poros complejos que atacan la membrana sobre las células revestidas con anticuerpos. Estos poros alteran la integridad de la membrana celular, matando a la célula diana (véase *Immunobiology*, 6ª ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, Capítulo 2).

[0056] El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos", o ADCC, es un mecanismo para inducir la muerte de células que depende de la interacción de células diana revestidas de anticuerpos con células inmunitarias que poseen una actividad lítica (también denominadas células efectoras). Tales células efectoras incluyen células asesinas naturales, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Las células efectoras se acoplan a uno o más dominios efectores Fc de la Ig unida a las células diana a través de sus sitios de combinación con antígenos. La muerte de la célula diana revestida de anticuerpos ocurre como resultado de la actividad de las células efectoras.

[0057] El término "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos", o ADCP, se refiere al proceso mediante el cual las células revestidas con anticuerpos son internalizadas, en su totalidad o en parte, por las células inmunitarias fagocíticas (por ej., macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) que se unen a uno o más dominios efectores Fc de la Ig.

[0058] El término "citotoxicidad dependiente del complemento", o CDC, se refiere a un mecanismo para inducir la muerte celular en donde uno o más dominios efectores Fc de un anticuerpo unido a una célula diana activa una serie de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de orificios en la membrana de la célula diana. Normalmente, los complejos antígeno-anticuerpo como los presentes en las células diana revestidas con anticuerpos se unen y activan el componente del complemento C1q que, a su vez, activa la cascada del complemento que lleva a la muerte de las células diana. La activación del complemento también puede resultar en la

deposición de los componentes del complemento sobre la superficie de las células diana lo que facilita la ADCC al unir los receptores del complemento (por ej., CR3) sobre leucocitos.

5 [0059] "Célula inmunitaria" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula de linaje hematopoyético involucrada en la regulación de una respuesta inmunitaria. En realizaciones típicas, una célula inmunitaria es un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, un monocito/macrófago, o una célula dendrítica.

10 [0060] "Célula efectora" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula que expresa un receptor de superficie para el dominio Fc de una inmunoglobulina (FcR). Por ejemplo, las células que expresan FcR de superficie para IgG, incluidos los FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRI (CD64), pueden actuar como células efectoras. Tales células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos.

[0061] Un "agente terapéutico" es un agente que ejerce un efecto citotóxico, citostático y/o inmunomodulador en células cancerosas, células inmunitarias activadas u otras poblaciones de células diana. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes citostáticos y agentes inmunomoduladores.

15 [0062] Un "efecto citotóxico" se refiere al agotamiento, eliminación y/o muerte de una célula diana. Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico en una célula. Con el término se pretende incluir a isótopos radioactivos (tales como I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal, y fragmentos de las mismas. Tales agentes citotóxicos pueden acoplarse a un anticuerpo, por ej., un anticuerpo anti-CD70 humanizado, y utilizarse, por ejemplo, para tratar a un paciente al que se le ha indicado una terapia con el anticuerpo. En una realización, "agente citotóxico" incluye anticuerpos monoclonales, por ej., anticuerpos utilizados en combinación con los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento.

20

[0063] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona); camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina) y derivados de los mismos; criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina, auristatina (incluidos los análogos monometilauristatina E y monometilauristatina F (véase, por ej., la Solicitud de Patente Publicada en los Estados Unidos N.º. 2005- 0238649, publicada del 27 de octubre de 2005, incorporada en este documento en su totalidad); duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina; trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de endinas (por ej., calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma II y calicheamicina phi II, véase por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; dinemicina, incluyendo la dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronata; esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos de cromoproteína de enediína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (AdriamycinTM) (incluidas morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2- pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirrubucina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexata y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico, tales como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; Ionidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona, mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK^R; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricótesenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ej.,

25

30

35

40

45

50

55

paclitaxel (TAXOL^R, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE^R, Rhône- Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina (GemzarTM); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NavelbineTM); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; y las sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERM), incluidos, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el NolvadexTM), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FarestonTM); inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MegaceTM), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (RivisorTM), letrozol (FemaraTM) y anastrozol (ArimidexTM); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprórido y goserelina; y las sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

[0064] El término "profármaco", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un precursor o a una forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica a las células tumorales que el fármaco original y es capaz de ser activado o convertido enzimáticamente en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", en *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615° Encuentro, Belfast; y Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", en: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), págs. 247-267, Humana Press. Entre los profármacos útiles cabe incluir, entre otros, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida y profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden ser convertidos en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivatizados en forma de profármaco incluyen, aunque no exclusivamente, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

[0065] Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" se refiere a un agente que tiene un efecto citostático sobre una célula, inhibiendo así el crecimiento y/o expansión de un subgrupo específico de células.

[0066] El término "efecto inmunomodulador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una estimulación (inmunoestimuladora) o inhibición (inmunosupresora) del desarrollo o mantenimiento de una respuesta inmunológica. La inhibición puede ser efectuada, por ejemplo, por eliminación de células inmunitarias (por ej., linfocitos T o B); inducción o generación de células inmunitarias capaces de modular (por ej., disminuir) la capacidad funcional de otras células; inducción de un estado insensible en células inmunitarias (por ej., aneria); o aumento, reducción o cambio de la actividad o función de las células inmunitarias, incluida, por ejemplo, la alteración del patrón de proteínas expresado por esas células (por ej., producción y/o secreción alteradas de ciertas clases de moléculas, tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, quinasas, moléculas coestimuladoras u otros receptores de superficie celular, y análogos). Un "agente inmunomodulador" se refiere a un agente que tiene un efecto inmunomodulador en una célula. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula inmunitaria lo que promueve una respuesta inmunitaria.

[0067] El término "marca" se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. La marca puede ser detectable por sí misma (por ej., marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la modificación química de un compuesto o una composición del sustrato que es detectable. El anticuerpo anti-CD70 marcado puede prepararse y utilizarse en varias aplicaciones incluyendo los diagnósticos *in vitro* e *in vivo*.

[0068] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es una distinta de la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas por lo tanto se diferencian de la molécula de ácido nucleico ya que existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en las células que normalmente expresan el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica distinta a la de las células naturales.

[0069] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de polinucleótidos necesarias para la expresión de una secuencia de codificación enlazada operativamente en un organismo hospedador en particular. Las secuencias de control adecuadas para su uso en las células procariontas incluyen, por ejemplo, las secuencias promotora, operadora y de sitio de unión al ribosoma. Las secuencias de control eucarióticas incluyen, aunque no exclusivamente, las promotoras, las señales de poliadenilación y potenciadoras. Estas secuencias de control pueden utilizarse para la expresión y producción de un agente de unión a un anti-CD70 en las células hospedadoras procariontas y eucarióticas.

[0070] Una secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una presecuencia de ácido nucleico o líder secretora está unida operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si se encuentra colocado de tal manera que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de una líder secretora, contigua y en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores están opcionalmente contiguos. La unión puede realizarse por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si no existieran tales sitios, pueden utilizarse adaptadores o enlazadores para unir las secuencias de ADN.

[0071] 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 incluidos en la definición de un polipéptido. Dentro de la definición de polipéptidos también están incluidos los "anticuerpos" tal como se definen en el presente documento. Una "región polipeptídica" se refiere a un segmento de un polipéptido, cuyo segmento puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o motivos (por ej., una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido que tiene en general al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido. Un "derivado" es un polipéptido o fragmento del mismo que tiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas o conservativas respecto de un segundo polipéptido; o un polipéptido o fragmento del mismo que se modifica mediante la unión covalente de una segunda molécula tal como, por ej., mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, y análogos. Dentro de la definición de "derivado" también están incluidos, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (por ej., aminoácidos artificiales y análogos), los polipéptidos con enlaces sin sustituir, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como artificiales.

[0072] Un polipéptido "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas u otros solutos proteínicos o no proteínicos. Un polipéptido aislado incluye un anticuerpo aislado, o un fragmento o derivado del mismo. El "anticuerpo" incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no se encontrará presente.

[0073] En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más de un 95 % en peso del anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, y en otros aspectos a más del 99 % en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata.

[0074] El término "heterólogo", en el contexto de un polipéptido, significa de una fuente diferente (por ej., una célula, tejido, organismo o especie) en comparación con otro polipéptido, de modo que los dos polipéptidos son diferentes. Normalmente, un polipéptido heterólogo es de una especie diferente.

[0075] En el contexto de los polipéptidos de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos, "sustitución conservativa" significa una o más sustituciones de aminoácidos que no reducen sustancialmente la unión específica (por ej., determinado según la K_D) del polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo a un antígeno (a saber, sustituciones que aumentan la afinidad de unión, que no alteran significativamente la afinidad de unión o que reducen la afinidad de unión en no más de un 40 % aproximadamente, normalmente no más de un 30 %, de manera más normal no más de un 20 %, de manera más normal todavía no más de un 10 %, y de la manera más normal de todas no más de un 5 %, según lo determinado mediante ensayos de unión habituales, por ej., ELISA).

[0076] Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, cuando se comparan o alinean para ver la correspondencia máxima. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean a efectos

de obtener una comparación óptima (por ej., pueden introducirse espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para obtener el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o nucleótidos 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 compartido por las secuencias (a saber, % de identidad = n° . de posiciones idénticas/ n° . total de posiciones (por ej., posiciones superpuestas) x 100). En algunas realizaciones, las dos secuencias tienen la misma longitud.

[0077] El término "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; normalmente al menos un 70 % o al menos un 75 % de identidad; más normalmente al menos un 80 % o al menos un 85 % de identidad; e incluso más normalmente al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % de identidad (por ej., según lo determinado utilizando uno de los métodos que se exponen más adelante).

[0078] Los términos "similitud" o "porcentaje de similitud" en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales o han sido sustituidos de manera conservativa cuando se comparan y alinean para ver la correspondencia máxima, según lo determinado utilizando uno de los métodos que se exponen más adelante. A modo de ejemplo, se puede considerar que una primera secuencia de aminoácidos es similar a una segunda secuencia de aminoácidos cuando la primera secuencia de aminoácidos es al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % ó 95 % idéntica, o ha sido 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 un alineamiento de polipéptidos que se ha alineado mediante, por ej., uno de los métodos que se exponen más adelante.

[0079] Los términos "similitud sustancial" o "sustancialmente similar", en el contexto de las secuencias de polipéptidos, indica que una región de polipéptidos tiene una secuencia con al menos un 70 %, normalmente al menos un 80 %, más normalmente al menos un 85 %, o al menos un 90 % o al menos un 95 % de similitud de la secuencia que una secuencia de referencia. Por ejemplo, un polipéptido es sustancialmente similar a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren en una o más sustituciones conservativas.

[0080] En el contexto de los anticuerpos anti-CD70, o derivados de los mismos, una proteína que tiene una o más regiones de polipéptidos sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más regiones de unión al antígeno (por ej., una región variable de la cadena pesada o ligera, o una CDR de la cadena pesada o ligera) de un anticuerpo anti-CD70 retiene la unión específica a un epítipo de la CD70 reconocido por el anticuerpo anti-CD70, según lo determinado mediante el uso de cualquiera de los distintos inmunoensayos habituales conocidos en la técnica o tal como se menciona en el presente documento.

[0081] 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 preferente, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Tal algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse 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 alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. De manera alternativa, puede utilizarse PSI-Blast para realizar una búsqueda repetida capaz de detectar relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ej., XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo de un 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 forma parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede utilizarse una tabla de residuos por pesos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Hay otros algoritmos adicionales para el análisis de secuencias conocidos en la técnica entre los que cabe incluir 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. USA 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 están comparando observando los pares de residuos alineados; si $ktup=1$, se examinan aminoácidos alineados individuales, $ktup$ se puede ajustar en 2 ó en 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 proteínas y 6 para ADN. De manera alternativa, el alineamiento de secuencias de proteínas puede llevarse a cabo utilizando el algoritmo CLUSTAL W, según lo descrito por Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[0082] Tal como se utilizan en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie de las mismas. Así, "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende además que puede que no toda la progenie sea precisamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la observada en la célula originalmente transformada. En caso de tener designaciones distintas, estas quedarán aclaradas por el contexto.

[0083] El término "sujeto" a efectos de tratamiento se refiere a cualquier animal, en particular un animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológico, para practicar deporte o de compañía como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente, el sujeto es humano.

[0084] Un "trastorno", tal como se utiliza en el presente documento, y los términos "trastorno asociado a la CD70" y "enfermedad asociada a la CD70" se refiere a cualquier condición que se beneficiaría de un tratamiento con un agente de unión a un anti- CD70, tal como se describe aquí dentro. Un "trastorno asociado a la CD70" y "enfermedad asociada a la CD70" normalmente expresan la CD70, o un fragmento de la misma, sobre la superficie celular. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitativos o trastornos a tratar incluyen en el presente documento el cáncer, neoplasias hematológicas, tumores benignos y malignos, leucemias y afecciones linfoides, carcinomas, y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Ejemplos específicos de trastornos se presentan más adelante.

[0085] Los términos "tratamiento" y "terapia", y análogos, tal como se utilizan en el presente documento, pretenden incluir medidas terapéuticas además de profilácticas o supresoras para una enfermedad o trastorno que lleven a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluidos, entre otros, el alivio o reducción de uno o más síntomas, regresión, ralentización o interrupción de la progresión de la enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno, evitando o eliminando así todos los signos de la enfermedad o trastorno. En otro ejemplo, el término incluye la administración de un agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, la administración de un agente después de la aparición y después de que se hayan desarrollado los síntomas clínicos, cuando la administración afecte a los parámetros clínicos de la enfermedad o del trastorno, tal como el grado de lesión en los tejidos, o la cantidad o la extensión de la metástasis, ya conduzca o no el tratamiento a la mejora de la enfermedad, comprende "tratamiento" o "terapia" tal como se utiliza en el presente documento.

[0086] Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "prevención" o "prevenir" se refieren a la administración de un agente de unión a un anti-CD70 a un sujeto antes del inicio de un síntoma clínico o diagnóstico de un cáncer que expresa la CD70 o trastorno inmunológico (por ej., la administración a un individuo con una predisposición o riesgo elevado de padecer el cáncer que expresa la CD70 o el trastorno inmunológico) para (a) bloquear la aparición o el inicio del cáncer que expresa la CD70 o del trastorno inmunológico, o uno o más síntomas clínicos o diagnósticos del mismo, (b) inhibir la gravedad del inicio del cáncer que expresa la CD70 o el trastorno inmunológico, o (c) disminuir la probabilidad del inicio del cáncer que expresa la CD70 o del trastorno inmunológico.

[0087] El término "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un agente, por ej., un agente terapéutico, en la vena de un paciente animal o humano durante un período de tiempo superior a 15 minutos aproximadamente, generalmente de entre 30 y 90 minutos aproximadamente.

[0088] El término "bolo intravenoso" o "inyección intravenosa rápida" se refiere a la administración de un fármaco en la vena de un animal o humano de tal manera que el cuerpo reciba el fármaco en 15 minutos aproximadamente o menos, generalmente 5 minutos o menos.

[0089] El término "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un agente, por ej., un agente terapéutico, bajo la piel de un paciente animal o humano, normalmente dentro de una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración relativamente lenta y constante desde un receptáculo con el fármaco. El pellizco o retirada de la piel hacia arriba separándola del tejido subyacente puede crear la bolsa.

[0090] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

5 [0091] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como un anticuerpo) a un mamífero. Los componentes del liposoma normalmente se encuentran dispuestos en forma de doble capa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

10 [0092] El término "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, preferentemente dentro de una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración relativamente lenta y constante desde un receptáculo con el fármaco durante un período de tiempo que incluye, aunque no exclusivamente, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede hacerse mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración del fármaco implantada bajo la piel del paciente animal o humano, donde la bomba administra una cantidad predeterminada de fármaco durante un período de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarque la duración del régimen de tratamiento.

15 [0093] El término "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de un fármaco por debajo de la piel de un paciente animal o humano, donde la administración del bolo de fármaco es menor de 15 minutos aproximadamente, en otro aspecto, menor de 5 minutos, y en otro aspecto más, menor de 60 segundos. En incluso otro aspecto más, la administración se realiza dentro de una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, en donde la bolsa puede crearse pellizcando o retirando la piel hacia arriba, separándola del tejido subyacente.

20 [0094] El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de agente que se une a un anti-CD70 (por ej., un anticuerpo o derivado u otro agente de unión) suficiente para inhibir la aparición o mejorar uno o más síntomas clínicos o diagnósticos de un cáncer que expresa la CD70 o trastorno inmunológico en un sujeto. Una cantidad efectiva de un agente se administra conforme a los métodos descritos en el presente documento en un "régimen efectivo". El término "régimen efectivo" se refiere a una combinación de la cantidad de agente y la frecuencia de la dosis adecuada para conseguir el tratamiento o prevención de un cáncer que expresa la CD70 o trastorno inmunológico.

25 [0095] El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se utiliza para referirse a una cantidad de un agente terapéutico que produce un resultado beneficioso en el paciente, por ejemplo, el efecto de detener el crecimiento o provocar la supresión de la célula. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva tiene actividad apoptótica, o es capaz de inducir la muerte celular. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la concentración sérica objetivo que ha demostrado ser eficaz en, por ejemplo, ralentizar la progresión de la enfermedad. La eficacia puede medirse de formas convencionales, dependiendo de la condición a tratar. Por ejemplo, en enfermedades neoplásicas o trastornos caracterizados por células que expresan la CD70, la eficacia se puede medir evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) o determinando las velocidades de respuesta (RR).

30 [0096] El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal, o que se ha incluido en la Farmacopea de los EE.UU., o en otra farmacopea reconocida en general para uso en animales y, más concretamente, en humanos. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra un agente de unión a un anti-CD70.

35 [0097] La frase "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un agente de unión a un anti-CD70 o agente terapéutico. El agente de unión a un anti-CD70 o agente terapéutico contiene al menos un grupo amino y, por consiguiente, con este grupo amino u otros grupos adecuados pueden formarse sales de adición ácidas. Ejemplos de sales incluyen, entre otras, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (a saber, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión de acetato, un ión de succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que establezca la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. En los casos en los que varios átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener varios contraiones. Así pues, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

[0098] "Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refiere a una asociación de una o más moléculas solventes y un agente de unión a un anti-CD70 y/o agente terapéutico. Ejemplos de solventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

5 [0099] La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina- fenilalanina-p-fenilendiamina.

[0100] La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E.

[0101] La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido para-acetil benzoico.

10 [0102] La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido benzoilvalérico.

[0103] La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina.

[0104] Las abreviaturas "fk" y "phe-lys" se refieren al ligador fenilalanina-lisina.

//. Anticuerpos anti-CD70 y derivados de los mismos

15 [0105] Las composiciones y usos descritos en el presente documento conforme a las reivindicaciones abarcan el uso de un agente de unión a la CD70 que se une específicamente a la CD70. El agente de unión a la CD70 puede ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre células cancerosas que expresan la CD70, células inmunitarias activadas u otras células diana. El agente de unión a la CD70 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70, un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo anti-CD70, un derivado del mismo u otro agente de unión a la CD70 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo que se une a la CD70.

20 [0106] En un aspecto, el agente de unión a la CD70 comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR del anticuerpo monoclonal 1F6. (El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del 1F6 se muestran en la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, y SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 22, respectivamente, y se presentan en la Publicación de Patente Internacional N°. WO 04/073656; por ejemplo, el agente de unión puede incluir una CDR de la cadena pesada y/o una CDR de la cadena ligera idéntica o sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada correspondiente (regiones H1, H2 ó H3) o CDR de la cadena ligera correspondiente (regiones L1, L2 ó L3) del mAb 1F6. En realizaciones típicas, el agente de unión a un anti-CD70 tiene dos o tres CDR de la cadena pesada y/o dos o tres CDR de la cadena ligera que son idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDR de la cadena pesada y/o ligera correspondiente del mAb 1F6.

25 [0107] Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que el agente de unión al anti-CD70 tiene al menos una CDR en la cadena pesada sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada del mAb 1F6, el agente de unión puede incluir además al menos una CDR en la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena ligera del mAb 1F6.

30 [0108] En algunas realizaciones, el agente de unión al anti-CD70 incluye un dominio variable de las cadenas pesada o ligera, en donde el dominio variable tiene (a) un grupo de tres CDR idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDR del mAb 1F6 correspondientes, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales de región variable de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede incluir uno o más dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras, en donde el o los dominios variables tienen (a) un grupo de tres CDR, en donde el grupo de CDR son del anticuerpo monoclonal 1F6, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales derivadas de una IgG humana. El anticuerpo puede incluir opcionalmente una región de bisagra. En una realización de ejemplo, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo totalmente humanizado.

35 [0109] En un aspecto, el agente de unión a la CD70 comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR del anticuerpo monoclonal 2F2. (El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del 2F2 se muestran en la SEC ID N°:27 y SEC ID N°:28, y SEC ID N°: 29 y SEC ID N°: 30, respectivamente, y se presentan en la Publicación de Patente Internacional N°. WO 04/073656; por ejemplo, el agente de unión puede incluir una CDR en la cadena pesada y/o una CDR en la cadena ligera idéntica o sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada correspondiente (regiones H1, H2 ó H3) o CDR de la cadena ligera correspondiente (regiones L1, L2 ó L3) del mAb 2F2. En realizaciones típicas, el

agente de unión a un anti-CD70 tiene dos o tres CDR en la cadena pesada y/o dos o tres CDR en la cadena ligera que son idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDR de la cadena pesada y/o ligera correspondiente del mAb 2F2.

5 [0110] Por ejemplo, cuando un agente de unión al anti-CD70 tiene al menos una CDR en la cadena pesada sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena pesada del mAb 2F2, el anticuerpo o derivado del mismo puede incluir además al menos una CDR en la cadena ligera que es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de la cadena ligera del mAb 2F2.

10 [0111] El agente de unión al anti-CD70 incluye un dominio variable de las cadenas pesadas o ligeras, en donde el dominio variable tiene (a) un grupo de tres CDR idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las CDR del mAb 2F2 correspondientes, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales de región variable de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede incluir uno o más dominios variables en las cadenas pesadas y/o ligeras, en donde el o los dominios variables tienen (a) un grupo de tres CDR, en donde el grupo de CDR son del anticuerpo monoclonal 2F2, y (b) un grupo de cuatro regiones estructurales derivadas de una IgG humana. El anticuerpo puede incluir opcionalmente una región de bisagra. En un ejemplo, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo totalmente humanizado.

20 [0112] En algunas realizaciones, las regiones estructurales se seleccionan de las secuencias V_H , J_H , V_K y J_K de los exones de la línea germinal humana. Por ejemplo, las secuencias para la humanización de la FR de un dominio V_H del c1F6 pueden seleccionarse de los exones V_{H1-18} (Matsuda et al., 1993, Nature Genetics 3:88-94) o V_{H1-2} (Shin et al., 1991, EMBO J. 10:3641-3645) para la V_H y para la región de bisagra (J_H), del exón J_{H-6} (Mattila et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25:2578-2582) de la línea germinal. En otros ejemplos, pueden seleccionarse el exón B3 para la V_K (Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836) y el exón J_{K-1} para la J_K (Hieter et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522) de la línea germinal como secuenciasceptoras para la humanización del dominio V_L del c1F6.

25 [0113] En algunas realizaciones, la secuencia de la región estructural del anticuerpo anti-CD70 humanizado incluye un derivado del exón de la línea germinal humana aceptora utilizado, incluyendo derivados en los que se reintroducen residuos donadores de ratón. Estos residuos incluyen la reintroducción del residuo donador de ratón en una o más de las posiciones H46, H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82, H82A y H91 del dominio V_H , conforme a la convención de numeración de Kabat.

[0114] En la tabla siguiente se indican las regiones del 1F6 humanizado a las que corresponde cada SEC ID N°.

Tabla 1

MOLÉCULA	NUCLEÓTIDO O AMINOÁCIDO	SEC ID N°
Región variable de cadena pesada del c1F6	Nucleótido	1
Región variable de cadena pesada del c1F6	Aminoácido	2
Dominio constante $hV_{H-D} + hIlgG_1$ del h1F6	Nucleótido	3
Dominio constante $hV_{H-D} + hIlgG_1$ del h1F6	Aminoácido	4
hV_{H-E} del h1F6	Nucleótido	5
hV_{H-E} del h1F6	Aminoácido	6
Dominio constante $hV_{H-E} + hIlgG_1$ del h1F6	Nucleótido	7
Dominio constante $hV_{H-E} + hIlgG_1$ del h1F6	Aminoácido	8

ES 2 477 765 T3

hV _H -H del h1F6	Nucleótido	9
hV _H -H del h1F6	Aminoácido	10
Dominio constante hV _H -H + hIgG ₁ del h1F6	Nucleótido	11
Dominio constante hV _H -H + hIgG ₁ del h1F6	Aminoácido	12
hV _H -J del h1F6	Nucleótido	13
hV _H -J del h1F6	Aminoácido	14
Dominio constante hV _H -J + hIgG ₁ del h1F6	Nucleótido	15
Dominio constante hV _H -J + hIgG ₁ del h1F6	Aminoácido	16
hV _H -M del h1F6	Nucleótido	17
hV _H -M del h1F6	Aminoácido	18
Dominio constante hV _H -M + hIgG ₁ del h1F6	Nucleótido	19
Dominio constante hV _H -M + hIgG ₁ del h1F6	Aminoácido	20
Región variable de la cadena ligera del c1F6	Nucleótido	21
Región variable de la cadena ligera del c1F6	Aminoácido	22
hV _L A	Nucleótido	23
hV _L A	Aminoácido	24
Dominio constante hV _L A + k humana	Nucleótido	25
Dominio constante hV _L A + k humana	Aminoácido	26
Región variable de la cadena pesada del c2F2	Nucleótido	27
Región variable de la cadena pesada del c2F2	Aminoácido	28
Región variable de la cadena pesada del c2F2	Nucleótido	29
Región variable de la cadena pesada del c2F2	Aminoácido	30

[0115] En la divulgación, el agente de unión a la CD70 puede ser un anticuerpo humanizado o un fragmento que se une al antígeno del anticuerpo 1F6 ó 2F2. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:6, SEC ID N°:10, SEC ID

Nº:14, SEC ID Nº:18, o aminoácidos 20-137 de SEC ID Nº:4. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:24.

[0116] En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 80 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:10, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:18, o aminoácidos 20-137 de SEC ID Nº:4. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 85 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:6, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:18, o aminoácidos 20-137 de SEC ID Nº:4. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:6, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:18, o aminoácidos 20-137 de SEC ID Nº:4. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 95 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:6, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº:18, o aminoácidos 20-137 de SEC ID Nº:4. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 99 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:6, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 18, o aminoácidos 20-137 de SEC ID Nº:4. En la divulgación, el polipéptido no tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1F6 ó 2F2.

[0117] En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 80 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:24. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica a menos en un 85 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:24. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:24. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 95 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:24. En la divulgación, el anticuerpo o fragmento que se une al antígeno comprende una cadena polipeptídica que es idéntica al menos en un 99 % a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:24. En la divulgación, el polipéptido no tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1F6 ó 2F2.

[0118] En la divulgación, el agente de unión al anti-CD70 compite con el anticuerpo monoclonal 1F6 ó 2F2 por unirse a la CD70 humana. En la divulgación, el agente de unión a la CD70 no induce ninguna señal agonística o antagonística cuando se une a la CD70 (por ej., no estimula la proliferación). En la divulgación, el agente de unión a la CD70 bloquea la unión de la CD27 a la CD70 en al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 %.

[0119] El agente de unión a la CD70 puede incluir opcionalmente un dominio efector de un anticuerpo que media o estimula una respuesta ADCC, ADCP y/o CDC contra una célula diana que expresa la CD70. El o los dominios efectores pueden ser, por ejemplo, un dominio Fc o dominios de una molécula de Ig. Tal agente de unión a la CD70 puede ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre células cancerígenas que expresan la CD70, o ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre linfocitos o células dendríticas activadas, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer que expresa la CD70 o un trastorno inmunológico, respectivamente. Normalmente, el agente de unión a la CD70 recluta y/o activa leucocitos citotóxicos (por ej., células asesinas naturales (NK), células fagocíticas (por ej., macrófagos) y/o componentes complementarios del suero).

[0120] El anticuerpo anti-CD70 puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un scFv, a diacuerpo, un Fab, a minicuerpo, un scFv-Fc, un Fv, o análogos. En algunas realizaciones, una región que se une al antígeno de la CD70 puede estar unida a uno o más dominios efectores de modo que, por ejemplo, los dominios bisagra-C_H2-C_H3 de una inmunoglobulina, o una porción o fragmento de uno o más dominios efectores tenga una función efectora. Los fragmentos de anticuerpo que se unen al antígeno, incluyendo los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender, por ejemplo, la o las regiones variables en combinación con la totalidad o con una porción de un dominio efector (por ej., un dominio C_H2 y/o C_H3 por sí solo o en combinación con un dominio C_H1, bisagra y/o C_L). Además, los fragmentos que se unen al antígeno pueden comprender cualquier combinación de dominios efectores. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 puede ser un anticuerpo de cadena sencilla que comprende una región variable que se une a la CD70 unida a dominios bisagra-C_H2-C_H3.

[0121] Los dominios efectores del anticuerpo anti-CD70 pueden proceder de cualquier isotipo de las inmunoglobulinas humanas adecuado. Por ejemplo, la capacidad de la inmunoglobulina humana de mediar CDC y ADCC/ADCP es generalmente del orden de IgM-IgG 1~IgG3>IgG2>IgG4 e IgG1~IgG3>IgG2/IgM/IgG4, respectivamente. Un polipéptido que se une a la CD70 puede expresarse como una proteína de fusión recombinante que comprende los dominios constantes apropiados para obtener la o las funciones efectoras deseadas. Tras unirse a las células diana, los anticuerpos anti-CD70 o derivados pueden disparar la destrucción de las células diana in vitro e in vivo a través de una función efectora de anticuerpo, tal como ADCC, CDC y ADCP.

[0122] El agente de unión a la CD70 se puede conjugar opcionalmente con un agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. En el presente documento se describen agentes terapéuticos adecuados.

5 [0123] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 puede ser quimérico, que comprende una región Fc humana o no humana o una porción de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir un dominio Fc o porción de origen no humano, por ej., de roedor (por ej., ratón o rata), burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de indias, camélido, caballo, pollo o mono (por ej., macacos, rhesus o análogos).

10 [0124] Un agente que se une a un anti-CD70, tal como un anticuerpo, puede ser monoespecífico, biespecífico, triespecífico o de una multiespecificidad mayor. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de la CD70 y/o pueden ser específicos tanto para la CD70 como para una proteína heteróloga. (Véanse, por 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; Patentes Estadounidenses n.º. 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 el presente documento, son anticuerpos que se unen de manera inmuno-específica tanto a la CD70 (que incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos que tienen las CDR de los anticuerpos monoclonales 2F2 y 1F6) y un segundo receptor o complejo receptor de la superficie celular que media ADCC, ADCP y/o CDC, tal como los receptores CD16/FcγRIII, CD64/FcγRI, receptores asesinos inhibidores o activadores, o la proteína de control del complemento CD59. En algunas realizaciones, la unión de la porción del anticuerpo multiespecífico a la segunda molécula o complejo receptor de la superficie celular puede aumentar las funciones del anticuerpo anti-CD70 o de otro agente de unión a la CD70.

15 [0125] Los anticuerpos anti-CD70 y los derivados de los mismos y otros agentes de unión también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión a la CD70. Las afinidades de unión típicas incluyen aquellas con 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.

25 [0126] Los anticuerpos se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante el uso de una amplia variedad de técnicas incluidas, por ej., el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de expresión en fagos, o una combinación de las mismas. De las técnicas de hibridomas se habla en general en, por ejemplo, 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). Ejemplos de los métodos de expresión en fagos que pueden utilizarse para producir los anticuerpos anti-CD70 incluyen, por ej., aquellos presentados en Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Quan y Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu and Fick Jr., eds., Marcel Dekker, New York, NY5, Capítulo 20, págs. 427-469; 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; Solicitud de PCT N.º. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 y Patentes Estadounidenses N.º. 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.

[0127] Ejemplos de las técnicas que pueden utilizarse para producir anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en las Patentes Estadounidenses 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.

45 [0128] Los métodos para la producción de anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulinas, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (véase, por ej., Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-39). Dada la variedad aleatoria de cadenas de inmunoglobulinas pesadas y ligeras, estos hibridomas (cuadrotas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales algunas tienen la estructura biespecífica correcta. Procedimientos similares se presentan en la Publicación Internacional N.º. WO 93/08829, y en Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-59.

50 [0129] De acuerdo con una aproximación diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión normalmente tiene lugar con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones C_H2, y C_H3. En algunas realizaciones, la fusión incluye una primera región constante de la cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión

de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y son cotransfectados en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas peptídicas en proporciones iguales resulta en rendimientos altos o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

[0130] En una realización de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos tienen una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma de separación fácil (véase, por ej., la Publicación Internacional N°. WO 94/04690).

[0131] Para obtener más información sobre anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210; Rodrigues et al., 1993, *J. Immunology* 151:6954-61; Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-67; Carter et al., 1995, *J. Hematotherapy* 4:463-70; Merchant et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-81. Mediante la utilización de dichas técnicas, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades tal como se definen en el presente documento.

[0132] En la Publicación de Patente Europea N° EP A 0 105 360 también se describen anticuerpos bifuncionales. Tal como se divulga en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse bien biológicamente, a saber, mediante técnicas de fusión de células, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos que forman puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos totales o fragmentos de los mismos. En la Publicación Internacional WO 83/03679 y en la Publicación de Patente Europea N°. EP A 0 217 577, por ejemplo, se presentan métodos para la obtención de tales anticuerpos híbridos.

[0133] En algunas realizaciones, los residuos estructurales de las regiones estructurales humanas se sustituirán por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de las CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ej., mediante la modelización de las interacciones de los residuos de las CDR y los residuos estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión al antígeno y mediante la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares (Véase, por ej., la Patente Estadounidense 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 incluyendo, por ejemplo, el injerto de CDR (véase, por ej., la EP 0 239 400; la Publicación PCT WO 91/09967; las Patentes Estadounidenses N°. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), el revestimiento o la modificación de la superficie (véase, por ej., la EP 0 592 106; la EP 0 519 596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973), y la reordenación aleatoria de cadenas (véase, por ej., la Patente Estadounidense N° 5.565.332).

[0134] Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la Publicación Internacional N°. WO 87/02671; Publicación de Patente Europea N°. 0 184 187; Publicación de Patente Europea N°. 0 171 496; Publicación de Patente Europea N°. 0 173 494; Publicación Internacional N°. WO 86/01533; Patente Estadounidense N°. 4.816.567; Publicación de Patente Europea N°. 0 012 023; Berter et al., 1988, *Science* 240:1041-43; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-26; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-18; Nishimura et al., 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-07; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Patentes Estadounidense N°. 5.225.539; Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-25; Verhoeyan et al., 1988, *Science* 239:1534; y Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141 :4053-60.

[0135] Como ya se ha indicado anteriormente, un agente de unión a la CD70 puede ser un derivado de un anticuerpo de la CD70. En general, un derivado de un anticuerpo anti-CD70 comprende un anticuerpo anti-CD70 (que incluye, por ej., un fragmento de unión a un antígeno o polipéptidos sustituidos de manera conservativa) y al menos una región polipeptídica u otra fracción heteróloga al anticuerpo anti-CD70. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede modificarse, por ej., mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula. Las modificaciones típicas incluye, por ej., la glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular (por ej., una molécula de unión a una albúmina) u otra proteína, y análogos. Puede llevarse a cabo cualquiera de las numerosas

modificaciones químicas que existen mediante técnicas conocidas, incluyendo, entre otras, la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc.

5 [0136] En la divulgación, la unión covalente no interfiere en la función efectora, por ej., prevenir que el derivado del anticuerpo se una específicamente a la CD70 a través de la región de unión al antígeno o región derivada del mismo, o que el o los dominios efectores se unan específicamente al receptor Fc.

10 [0137] En la divulgación, el derivado del anticuerpo es un multímero, tal como, por ejemplo, un dímero, que comprende uno o más monómeros, en donde 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, por ej., mediante sustitución conservativa de uno o más aminoácidos), y (ii) una región polipeptídica multimerizante (por ej., dimerizante), de forma que el derivado del anticuerpo forme multímeros (por ej., homodímeros) que se unen de manera específica a la CD70. Normalmente, 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 donde 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 la CD70, el derivado se somete a condiciones que permiten la formación de un homodímero o heterodímero. Un heterodímero, tal como se usa en el presente documento, puede comprender dominios de dimerización idénticos pero regiones de unión al antígeno de la CD70 diferentes, regiones de unión al antígeno de la CD70 idénticas pero dominios de dimerización diferentes, o regiones de unión al antígeno de la CD70 y dominios de dimerización diferentes.

20 [0138] 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 Vinson et al., 1989, Science 246:911-916). Entre los dominios de cremalleras de leucinas útiles cabe incluir, por ejemplo, aquellos del factor de transcripción de levaduras GCN4, el factor de transcripción de mamíferos CCAAT/proteína de unión a un potenciador C/EBP, y la transformación nuclear en productos de oncogenes, Fos y Jun. (Véase, por ej., Landschultz et al., 1988, Science 240:1759-64; Baxevaris 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, por ej., Murre et al., 1989, Cell 56:777-783. Véase también Davis et al., 1990, Cell 60:733-746; Voronova y Baltimore, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4722-26). Las proteínas hHLH especialmente útiles son myc, max y mac.

30 [0139] En la divulgación, 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 (por ej., un dominio C_H1, un dominio C_H2 y/o un dominio C_H3). (Véanse, por ej., las Patentes Estadounidenses N^o. 5.155.027; 5.336.603; 5.359.046; y 5.349.053; la EP 0 367 166; y la WO 96/04388).

35 [0140] Se sabe que los heterodímeros se forman 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. 5:1538-52; Williams et al., 1991, Genes Dev. 5:1553-67; Roman et al., 1990, Genes Dev. 4:1404-15) y entre miembros de las familias ATF/CREB y Fos/Jun families (Hai y Curran, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3720-24). Por lo tanto, cuando a un sujeto se le administra una proteína de unión a la CD70 en forma de un heterodímero que comprende diferentes dominios de dimerización, se puede utilizar cualquier combinación de los anteriores.

45 [0141] En la divulgación, un derivado del anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo anti-CD70 conjugado con un segundo anticuerpo (un "heteroconjugado de anticuerpos") (véase, por ej., la Patente Estadounidense N^o. 4.676.980). Los heteroconjugados útiles para poner en práctica los presentes métodos comprenden un anticuerpo que se une a la CD70 (por ej., un anticuerpo que tiene las CDR y/o cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales 2F2 ó 1F6) y un anticuerpo que se une a un receptor o complejo receptor de la superficie que media ADCC, fagocitosis y/o CDC, tal como CD16/FcγRIII, CD64/FcγRI, receptores de activación o inhibidores de células asesinas o la proteína de control del complemento CD59. Normalmente, la unión de la porción del anticuerpo multiespecífico a la segunda molécula o complejo receptor de la superficie celular mejora las funciones efectoras de un anticuerpo anti-CD70. En realizaciones de la invención, el anticuerpo puede ser un agente terapéutico. En el presente documento se describen agentes terapéuticos de anticuerpos adecuados.

55 [0142] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 o derivado del mismo inhibe de manera competitiva la unión del mAb 1F6 ó 2F2 a la CD70, tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para la determinación de la unión competitiva (tal como, por ej., los inmunoensayos descritos en el presente documento). En las realizaciones típicas, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de 1F6 ó 2F2 a la CD70 en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 % o al menos un 75 %. En otras realizaciones, el anticuerpo

inhibe de manera competitiva la unión de 1F6 ó 2F2 a la CD70 en al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %.

5 [0143] Se puede ensayar la unión específica de los anticuerpos a la CD70 mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos. Entre los inmunoensayos que se pueden utilizar cabe incluir, por ejemplo, los sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como Western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos 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 e inmunoensayos con proteína A. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. (Véase, por ej., Ausubel et al., eds., Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., New York, 4ª ed. 1999); Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1999).

15 [0144] Además, se puede determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a la 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 la CD70 marcada (por 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 a la CD70 marcada. A partir de los datos, puede determinarse entonces la afinidad del anticuerpo por la CD70 y la velocidad de disociación de la unión mediante un análisis de la representación de Scatchard. También se puede determinar la competición con un segundo anticuerpo (tal como, por ej., mAb 1F6 ó 2F2) mediante el uso de radioinmunoensayos. En este caso, la CD70 se incuba con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por 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 la CD70 y las velocidades de disociación de una interacción anticuerpo-CD70 mediante la resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD70 o derivados de los mismos se pueden dirigir y acumular sobre la membrana de una célula que expresa la CD70.

25 [0145] Los anticuerpos anti-CD70 y los derivados de los mismos se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica para la síntesis de proteínas, normalmente, por ej., mediante técnicas de expresión recombinante. La expresión recombinante de un anticuerpo o de un derivado del mismo que se une a la CD70 normalmente incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el derivado del mismo. Un vector para la producción de la molécula proteica puede producirse mediante la tecnología del ADN recombinante con el uso de métodos conocidos en la técnica. Para los métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, cultivo celular, incorporación de transgenes y expresión de proteínas recombinantes se pueden utilizar técnicas habituales, 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., 35 1989); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York, 4ª ed., 1999); y Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 2ª ed., 1998).

40 [0146] 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 nucleótida que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ej., la Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y la Patente Estadounidense N.º. 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en tal 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 anticuerpos de cadena doble, se pueden co-expresar vectores que codifican ambas cadenas pesada y ligera en la célula hospedadora para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina.

50 [0147] Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión en hospedadores procariontes y eucariotas para expresar un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo. Normalmente, para la expresión de la proteína recombinante se utilizan células eucariotas, en particular para las moléculas de anticuerpo anti-CD70 recombinantes completas. Por ejemplo, las células mamíferas tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector 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, por ej., Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

55 [0148] Otros sistemas de expresión en hospedadores incluyen, por ejemplo, los sistemas de expresión basados en plásmidos en células bacterianas (véase, por ej., Ruther et al., 1983, EMBO 1,2:1791; Inouye y Inouye, 1985,

Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); sistemas de insectos tales como, por 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, por ej., los sistemas basados en adenovirus (véase, por ej., Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359; Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

[0149] 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. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos (por ej., la glicosilación, fosforilación y escisión) de la proteína exógena expresada. Para este fin, se pueden utilizar 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.

[0150] Normalmente se utiliza 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 o de otro agente de unión a la CD70. 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 (por ej., secuencias promotoras y 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 utilizar varios sistemas de selección, incluidos, por ejemplo, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, que se pueden emplear en células tk^- , $hgprt^-$ o apr^- , respectivamente. Además, se puede utilizar la resistencia a antimetabolitos como base para la selección de los genes siguientes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato; *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico; *neo*, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418; e *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina. Para seleccionar el clon recombinante deseado pueden aplicarse de manera rutinaria los métodos conocidos habitualmente en la técnica de la tecnología del ADN recombinante, y tales métodos se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., John Wiley and 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 and Sons, N.Y., 1994, capítulos 12 y 13); y Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1.

[0151] Los niveles de expresión de un anticuerpo o de un derivado se pueden incrementar mediante la amplificación con vectores. (Véase en general, por 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, New York, 1987)). Cuando un marcador del sistema de vectores que expresa un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo es amplificable, un incremento del nivel de 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 Grouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

[0152] Cuando el anticuerpo anti-CD70 comprende tanto una cadena pesada como 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 utilizar un vector único que codifica, y es capaz de expresar, las dos proteínas de las cadenas pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se coloca normalmente 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 de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender cADN o ADN genómico.

[0153] Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo (por ej., mediante un animal, síntesis química o expresión recombinante), se puede purificar mediante cualquier método adecuado de purificación de proteínas, incluyendo, por ejemplo, mediante cromatografía (por 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 anti-cuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo puede, por ejemplo, fusionarse con una secuencia marcadora, como un péptido, para facilitar la purificación mediante cromatografía de afinidad. Entre las secuencias de aminoácidos marcadoras adecuadas cabe incluir, por ej., un péptido de hexa-histidina, como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 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 31:161), y el marcador "flag".

5 [0154] Una vez que se produce un anticuerpo anti-CD70 o un derivado del mismo, se determina su capacidad para ejercer un efecto citostático o citotóxico sobre las células cancerosas que expresan la CD70 o un efecto inmunomodulador sobre una célula inmunitaria que expresa la CD70 mediante los métodos descritos más adelante o tal como se conoce en la técnica.

10 [0155] Para minimizar la actividad del anticuerpo anti-CD70 fuera de las células inmunitarias activadas o de las células cancerosas que expresan la CD70, puede utilizarse un anticuerpo que se una de manera específica a la CD70 unida a la membrana celular, pero no a la CD70 soluble, de manera que el anticuerpo anti-CD70 se concentre en la superficie celular de la célula inmunitaria activada o de la célula cancerosa que expresa la CD70.

15 [0156] Normalmente, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado está sustancialmente purificado (por ej., sustancialmente exento de sustancias que limitan su efecto o provocan efectos secundarios indeseados. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado tiene una pureza de al menos un 40 % aproximadamente, de al menos el 50 % aproximadamente o de al menos el 60 % aproximadamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado tiene una pureza de al menos un 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % ó 95-98 % aproximadamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 o el derivado tiene una pureza del 99 % aproximadamente.

///. Otros agentes de unión a la CD70

20 [0157] Otros agentes de unión a la CD70 incluyen proteínas de fusión (es decir, proteínas que están fusionadas de manera recombinante o conjugadas químicamente (lo que incluye la conjugación tanto covalente como no covalente) con proteínas heterólogas (de normalmente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 aminoácidos). Tales agentes que se unen a la CD70 pueden incluir una porción que se une a la CD70 y un dominio efector de inmunoglobulina o un equivalente funcional del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, un equivalente funcional de un dominio efector de inmunoglobulina se une a un receptor Fc sobre una célula inmunitaria con una actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de uno o más dominios efectores del Fc a los componentes del sistema del complemento. La proteína de fusión no tiene por qué ser necesariamente directa sino que puede ocurrir a través de secuencias ligadoras.

30 [0158] Por ejemplo, un agente de unión a la CD70 puede producirse de manera recombinante fusionando la región de codificación de una o más de las CDR o la región variable de un anticuerpo anti-CD70 en el marco de lectura con una secuencia de codificación de una proteína heteróloga. La proteína heteróloga puede incluir, por ejemplo, un dominio efector, un equivalente funcional del mismo u otro dominio funcional para proporcionar una o más de las siguientes características: promover la expresión estable; proporcionar un medio para facilitar una expresión recombinante de alto rendimiento; proporcionar una actividad citostática, citotóxica o inmunomoduladora, y/o proporcionar un dominio de multimerización.

35 [0159] En algunas realizaciones, el agente de unión a la CD70 puede incluir, conforme a las reivindicaciones, una o más CDR de un anticuerpo que se unen a la CD70 y agotan o inhiben la proliferación de células que expresan la CD70 por sí sola, sin conjugación con un agente citotóxico.

IV. Métodos para mejorar las funciones efectoras de agentes que seleccionan como objetivo la CD70

40 [0160] En algunas realizaciones, la función efectora de un agente que se une a la CD70 se puede aumentar mejorando sus funciones efectoras haciendo uso de una o más de las aproximaciones de ingeniería de anticuerpos conocidas en la técnica. A continuación se proporcionan ejemplos ilustrativos, no limitantes, de tales aproximaciones.

45 [0161] La ADCC y la ADCP son mediadas por la interacción de los anticuerpos unidos a células con los receptores Fc γ (Fc γ R) expresados en células efectoras. Tanto el estado de glicosilación como la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG tienen efectos funcionales sobre la interacción Fc γ -Fc γ R. Una interacción Fc γ -Fc γ R más fuerte está asociada a una mayor destrucción de las células diana por parte de las células efectoras.

50 [0162] Los oligosacáridos que se encuentran unidos covalentemente a la Asn297 conservada están involucrados en la región Fc de una IgG para unirse a Fc γ R (Lund et al., 1996, J. Immunol. 157:4963-69; Wright and Morrison, 1997, Trends Biotechnol. 15:26-31). La ingeniería de esta glicofoma en IgG puede mejorar significativamente la ADCC mediada por la IgG. La adición de modificaciones de N-acetilglucosamina de bisección (Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotech. Bioeng. 74:288-94) a esta glicofoma o la retirada de fucosa (Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-40; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:6591-604; Niwa et al.,

2004, *Cancer Res.* 64:2127-33) de esta glicofoma son dos ejemplos de ingeniería de la Fc de la IgG que mejora la unión entre la Fc de la IgG Fc y el FcγR, aumentando así la actividad ADCC mediada por la Ig.

5 [0163] La sustitución sistémica de los aminoácidos expuestos a solventes de la región Fc de la IgG1 humana ha generado variantes de la IgG con afinidades de unión al FcγR alteradas (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). En comparación con la IgG1 original, un subgrupo de estas variantes que incluyen sustituciones en Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 o Ser298/Glu333/Lys334 a Ala demuestran un aumento tanto en afinidad de unión hacia el FcγR como de la actividad ADCC (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki et al., 2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49).

10 [0164] La CDC mediada por anticuerpos comienza con el enlace del C1q a las moléculas de IgG unidas a las células. Se ha informado de residuos de aminoácidos específicos en la IgG1 humana responsables de la unión al C1q y diferencias de unión al C1q específicas de la especie (Idusogie et al., 2000, *J. Immunol.* 164:4178-4184). La actividad de fijación del complemento de los anticuerpos se ha mejorado mediante sustituciones en Lys326 y Glu333; por ejemplo, tales sustituciones pueden mejorar tanto la unión del C1q como la actividad CDC del rituximab del anticuerpo IgG1 humano (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166:2571-2575). Las mismas sustituciones en la estructura básica de la IgG2 humana pueden convertir un isotipo de anticuerpo que se une mal al C1q y es extremadamente deficiente en la actividad de activación del complemento en uno capaz de unirse al C11 y de mediar una CDC (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166:2571-75). Se han aplicado también otros muchos métodos para mejorar la actividad de fijación del complemento de los anticuerpos. Por ejemplo, el injerto de un fragmento de cola carboxilo-terminal de 18 aminoácidos de IgM en los extremos carboxilo de la IgG aumenta enormemente su actividad CDC. Esto se observa incluso en el caso de la IgG4, que normalmente no tiene ninguna actividad CDC detectable (Smith et al., 1995, *J. Immunol.* 154:2226-36). También, la sustitución del Ser444 ubicado cerca del extremo carboxi-terminal de la cadena pesada de la IgG1 por Cys indujo la dimerización cola-cola de la IgG1 con un aumento de la actividad CDC 200 mayor respecto a la IgG1 monomérica (Shopes et al., 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22). Además, una estructura de díptico biespecífica con especificidad al C1q también confiere actividad CDC (Kontermann et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

30 [0165] La semivida in vivo de un anticuerpo también puede influir en sus funciones efectoras. En algunas realizaciones, resulta conveniente aumentar o reducir la semivida de un anticuerpo para modificar sus actividades terapéuticas. El FcRn es un receptor estructuralmente similar al antígeno de Clase I MHC que se asocia de manera no covalente a la β2-microglobulina. El FcRn regula el catabolismo de las IgG y sus transcitosis a través de tejidos (Ghetie y Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). La interacción IgG-FcRn se produce a un pH de 6,0 (pH de las vesículas intracelulares) pero no a un pH de 7,4 (pH de la sangre); esta interacción permite reciclar las IgG de vuelta a la circulación (Ghetie y Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Se ha mapeado la región de la IgG₁ humana involucrada en la unión al FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Sustituciones con alanina en las posiciones Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 o Asn434 de la IgG₁ humana aumentan la unión al FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Se espera que las moléculas de IgG₁ en las que se producen estas sustituciones tengan unas semividas en suero más largas. En consecuencia, estas moléculas de IgG₁ modificadas pueden ser capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras y, por lo tanto, ejercer sus eficacias terapéuticas, durante un período de tiempo más largo en comparación con una IgG₁ no modificada.

40 V. Ensayos de las actividades citotóxicas, citostáticas e inmunomoduladoras

[0166] Se conocen métodos para determinar si un anticuerpo media una función efectora contra una célula diana. Más adelante se describen ejemplos ilustrativos de tales métodos.

45 [0167] Para determinar si un anticuerpo anti-CD70 o un derivado media una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra células inmunitarias activadas o células cancerosas que expresan la CD70, puede utilizarse un ensayo que determina la muerte de células diana en presencia del anticuerpo y de células inmunitarias efectoras. Cualquier ensayo utilizado para determinar este tipo de citotoxicidad puede basarse en la determinación de la liberación de ⁵¹Cr de células diana marcadas metabólicamente tras la incubación en presencia de células efectoras y de anticuerpos específicos a las células diana tras la incubación en presencia de las células efectoras y de los anticuerpos específicos a las células diana (véase, por ej., Perussia y Loza, 2000, *Methods in Molecular Biology* 121:179-92; y ⁵¹Cr Release Assay of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC)" en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. eds., Wileyand Sons, 1993). Por ejemplo, las células inmunitarias activadas (por ej., linfocitos activados) o células cancerosas que expresan la CD70 marcadas con Na₂⁵¹CrO₄ y colocadas en placas a una densidad de 5.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos pueden tratarse a concentraciones variantes de anticuerpo anti-CD70 durante 30 minutos y, a continuación, mezclarse con células moleculares de sangre periférica humana (PBMC) durante 4 horas. La disrupción de la membrana que acompaña a la muerte de las células diana libera ⁵¹Cr en el sobrenadante del cultivo que puede ser recogido para evaluar su radioactividad como una medida de la actividad citotóxica. Otros ensayos para medir la ADCC pueden incluir marcadores no radiactivos o

basarse en la liberación inducida de enzimas específicas. Por ejemplo, hay disponible en el mercado un ensayo no radioactivo basado en una fluorimetría resuelta en el tiempo (Delphia, Perkin Elmer). Este ensayo se basa en cargar células diana con un éster de acetoximetilo de un ligando amplificador de la fluorescencia (BATDA) que penetra en la membrana celular y, a continuación, se hidroliza para formar un ligando hidrófilo impermeable a la membrana (TDA). Cuando se mezcla con un anticuerpo específico a la célula diana y a células efectoras PBMC, el TDA se libera de las células lisadas y queda disponible para formar un quelato altamente fluorescente cuando se mezcla con europio. La señal, medida como un fluorímetro resuelto en el tiempo, se correlaciona con la cantidad de lisis celular.

[0168] Para determinar si un anticuerpo anti-CD70 o derivado media una fagocitosis celular dependiente del anticuerpo contra células inmunitarias activadas o células cancerosas que expresan la CD70, puede utilizarse un ensayo que mide la internalización de las células diana por parte de las células inmunitarias efectoras (por ej., macrófagos recién cultivados o líneas celulares tipo macrófagos establecidas) (véase, por ej., Munn y Cheung, 1990, J. Exp. Med. 172:231-37; Keler et al., 2000, J. Immunol. 164:5746-52; Akewanlop et al., 2001, Cancer Res. 61 :4061-65). Por ejemplo, las células diana pueden marcarse con un colorante de membranas lipofílicas tal como PKH67 (Sigma), revestirse con un anticuerpo específico a las células diana y mezclarse con células inmunitarias efectoras durante un período de 4 a 24 horas. A continuación, pueden identificarse las células efectoras mediante una contratinción con un anticuerpo marcado con fluorocromo específico para un marcador de la superficie celular fagocítico (por ej., CD14) y las células analizadas mediante una citometría de flujo bicolor o microscopía de fluorescencia. Las células doble positivas representan las células efectoras que tiene células diana internalizadas. Para estos ensayos, las células efectoras pueden ser monocitos derivados de las PBMC que han sido diferenciados en macrófagos mediante un cultivo durante de 5 a 10 días con M-CSF o GM-CSF (véase, por ej., Munn y Cheung, más adelante). Las líneas celulares tipo macrófago humanas U937 (Larrick et al., 1980, J. Immunology 125:6-12) o THP-1 (Tsuchiya et al, 1980, Int. J. Cancer 26: 171 -76) disponibles en ATCC pueden utilizarse como alternativa a la fuente de células fagocíticas.

[0169] También se conocen métodos para determinar si un anticuerpo media una citotoxicidad dependiente del complemento tras unirse a células diana. Los mismos métodos pueden aplicarse para determinar si un agente que se une a la CD70 media una CDC en las células inmunitarias activadas o en células cancerosas que expresan la CD70. Más adelante se describen ejemplos ilustrativos de tales métodos.

[0170] La fuente de complemento activo puede ser bien un suero humano normal o purificado a partir de un animal de laboratorio incluidos los conejos. En un ensayo estándar, un agente de unión a la CD70 se incuba con células inmunitarias activadas que expresan la CD70 (por ej., linfocitos activados) o células cancerosas que expresan la CD70 en presencia de un complemento. La capacidad de tal agente de unión a la CD70 para mediar una lisis celular puede determinarse mediante varias lecturas. En un ejemplo, se utiliza en ensayo de liberación de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$. En este ensayo, las células diana se marcan con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$. El $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ no incorporado se aclara y las células se colocan en placas a una densidad apropiada, normalmente de entre 5.000 y 50.000 células/pocillo, en una placa de 96 pocillos. La incubación con el agente de unión a la CD70 en presencia de suero normal o de un complemento purificado normalmente dura de 2 a 6 horas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %. La radioactividad liberada, indicadora de la lisis celular, se determina en un alícuota del sobrenadante del cultivo mediante un recuento de rayos gamma. La lisis celular máxima se determina liberando el $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ incorporado con un tratamiento detergente (de un 0,5 a un 1 % de NP-40 o Tritón X-100). La lisis celular espontánea de fondo se determina en los pocillos en los que solo se encuentra presente el complemento sin ningún agente de unión a la CD70. El porcentaje de lisis celular se calcula a modo de (lisis inducida por el agente de unión a la CD70 – lisis espontánea)/lisis celular máxima. La segunda lectura es una reducción de colorantes metabólicos, por ej., Azul Alamar, a través de células viables. En este ensayo, las células diana se incuban con un agente que se une a la CD70 con un complemento y se incuban según lo descrito anteriormente. Al final de la incubación, se añade un 1/10 en volumen de Azul de Alamar (Biosource International, Camarillo, CA). Se continúa con la incubación hasta llegar a 16 horas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %. La reducción del Azul de Alamar como indicativo de las células viables metabólicamente activas se determina mediante un análisis fluorométrico con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. La tercera lectura es la permeabilidad de la membrana celular al yoduro de propidio (PI). La formación de poros en la membrana plasmática como resultado de la activación del complemento facilita la entrada del PI en las células donde se difundirá hasta el interior de los núcleos y se unirá al ADN. Tras la unión al ADN, la fluorescencia del PI en los 600 nm aumenta significativamente. El tratamiento de las células diana con el agente de unión a la CD70 y el complemento se lleva a cabo según lo descrito anteriormente. Al final de la incubación, se añade PI a una concentración final de 5 µg/ml. A continuación se examina la suspensión celular mediante una citometría de flujo utilizando un láser de argón de 488 nm para la excitación. Las células lisadas se detectan mediante emisión de fluorescencia a 600 nm.

VI. Modelos animales de trastornos inmunológicos o de cánceres que expresan la CD70

[0171] Los agentes que se unen al anti-CD70, por ej., anticuerpos o derivados, pueden ensayarse o validarse en modelos animales de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan la CD70. Los versados en la técnica ya

conocen una serie de modelos animales establecidos de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan la CD70, cualquiera de los cuales puede utilizarse para ensayar la eficacia del anticuerpo anti-CD70 o derivado. Más adelante se describen ejemplos no limitativos de tales métodos.

5 [0172] Ejemplos de modelos animales de enfermedades autoinmunes sistémicas o específicas a los órganos incluyen la diabetes, lupus, esclerosis sistémica, Síndrome de Sjögren, encefalomiелitis autoinmune experimental (esclerosis múltiple), tiroiditis, miastenia gravis, artritis, uveítis y enfermedad inflamatoria intestinal han sido descritos por Bigazzi, "Animal Models of Autoimmunity: Spontaneous and Induced," en *The Autoimmune Diseases* (Rose and Mackay eds., Academic Press, 1998) y en "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease," en *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., Wiley and Sons, 1997).

10 [0173] Las condiciones alérgicas, por ej., asma y dermatitis, también pueden ser modeladas en roedores. La hipersensibilidad de las vías respiratorias puede ser inducida en ratones con ovalbúmina (Tomkinson et al, 2001, *J. Immunol.* 166:5792-800) o con antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* (Tesciuba et al., 2001, *J. Immunol.* 167:1996-2003). La cepa Nc/Nga de ratones muestra un notable aumento de la IgE sérica y desarrolla espontáneamente lesiones tipo dermatitis atópica (Vestergaard et al., 2000, *Mol. Med. Today* 6:209-10; Watanabe et al., 1997, *Int. Immunol.* 9:461-66; Saskawa et al., 2001, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126:239-47).

15 [0174] La inyección de linfocitos donantes inmunocompetentes en un huésped histoincompatible irradiado letalmente es una aproximación clásica para inducir una GVHD en ratones. De manera alternativa, el modelo murino B6D2F1 original proporciona un sistema para inducir una GVHD aguda y crónica. En este modelo, los ratones B6D2F1 son una progenie F1 de un cruce entre las cepas originales de ratones C57BL/6 y DBA/2. La transferencia de células linfoides de DBA/2 en ratones B6D2F1 no irradiados causa una GVHD crónica, mientras que la transferencia de células linfoides de C57BL/6, C57BL/10 o B10.D2 causa una GVHD aguda (Slayback et al., 2000, *Bone Marrow Transpl.* 26:931-938; Kataoka et al., 2001, *Immunology* 103:310-318).

20 [0175] Adicionalmente, tanto las células madre hematopoyéticas humanas como las células linfoides de la sangre periférica maduras pueden injertarse en ratones SCID, y estas células linfohematopoyéticas permanecen 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 pequeño sistema de modelos animales para el ensayo directo de potenciales agentes terapéuticos en células linfoides humanas. (Véase, por ej., Tournoy et al., 2001, *J. Immunol.* 166:6982-6991).

25 [0176] Además, pueden crearse modelos de animales pequeños para examinar las eficacias in vivo de los anticuerpos anti-CD70 o derivados mediante la implantación de líneas celulares tumorales humanas que expresan la CD70 en las cepas de roedores inmunodeficientes apropiadas, por ej., ratones desnudos atímicos o ratones SCID. Ejemplos de líneas celulares de linfomas humanos que expresan la CD70 incluyen, por ejemplo, la Daudi (Ghetie et al., 1994, *Blood* 83:1329-36; Ghetie et al., 1990, *Int. J. Cancer* 15:481-85; de Mont et al., 2001, *Cancer Res.* 61:7654-59), la HS-Sultan (Cattan y Maung, 1996, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38:548-52; Cattan y Douglas, 1994, *Leuk. Res.* 18:513-22), la Raji (Ochakovskaya et al., 2001, *Clin. Cancer Res.* 7:1505-10; Breisto et al., 1999, *Cancer Res.* 59:2944-49), y la CA46 (Kreitman et al., 1999, *Int. J. Cancer* 81:148-55). Un ejemplo no limitativo de una línea del linfoma de Hodgking que expresa la CD70 es la L428 (Drexler, 1993, *Leuk. Lymphoma* 9:1-25; Dewan et al., 2005, *Cancer Sci.* 96:466-473). Ejemplos no limitativos de líneas celulares de carcinomas de células renales humanos que expresan la CD70 incluyen la 786-O (Ananth et al., 1999, *Cancer Res.* 59:2210-16; Breisto et al., 2001, *Cancer Res.* 61:1768-75), la ACHN (Hara et al., 2001, *J. Urol.* 166:2491-94; Miyake et al., 2002, *J. Urol.* 167:2203-08), Caki-1 (Prewett et al, 1998, *Clin. Cancer Res.* 4:2957-66; Shi y Siemann, 2002, *Br. J. Cancer* 87:119-26), y la Caki-2 (Zellweger et al., 2001, *Neoplasia* 3:360-67). Ejemplos no limitativos de líneas celulares de carcinomas nasofaríngeos que expresan la CD70 incluyen la Cl 5 y la Cl 7 (Busson et al., 1988, *Int. J. Cancer* 42:599-606; Bernheim et al., 1993, *Cancer Genet. Cytogenet.* 66:11-5). Ejemplos no limitativos de líneas celulares de gliomas humanos que expresan la CD70 incluyen la U373 (P alma et al, 2000, *Br. J. Cancer* 82:480-7) and U87MG (Johns et al, 2002, *Int. J. Cancer* 98:398-408). Ejemplos no limitativos de líneas celulares de mielomas múltiples incluyen la MM.1S (Greenstein et al., 2003, *Experimental Hematology* 31:271-282) y la L363 (Diehl et al., 1978, *Blut* 36:331-338). (Véase también Drexler y Matsuo, 2000, *Leukemia Research* 24:681-703). Estas líneas celulares tumorales pueden establecerse en huéspedes roedores inmunodeficientes bien como tumores sólidos mediante inyecciones subcutáneas o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez establecidos dentro de un huésped, estos modelos tumorales pueden aplicarse para evaluar las eficacias terapéuticas del anticuerpo anti-CD70 o de sus derivados tal como se describe en el presente documento a la hora de modular el crecimiento tumoral in vivo.

VII. Trastornos asociados a la CD70

55 [0177] Los agentes que se unen al anti-CD70 (por ej., anticuerpos y derivados) tal como se describe en el presente documento son útiles para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer que expresa la CD70 o de un

trastorno inmunológico caracterizado por la expresión de la CD70 por la activación inapropiada de las células inmunitarias (por ej., linfocitos o células dendríticas). Tal expresión de la CD70 puede deberse, por ejemplo, al aumento de los niveles de la proteína CD70 en la superficie de las células y/o la antigenicidad alterada de la CD70 expresada. El tratamiento o la prevención del trastorno inmunológico, conforme al uso descrito en el presente documento, se consigue administrando, a un sujeto que necesite tal tratamiento o prevención, una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD70 o derivado conforme a las reivindicaciones por el que el anticuerpo o derivado (i) se une a las células inmunitarias activadas que expresan la CD70 y que están asociadas al estado de la enfermedad y (ii) ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre las células inmunitarias activadas. En algunas realizaciones, el efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce sin conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. En algunas realizaciones, el efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce mediante la conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador.

[0178] Las enfermedades inmunológicas caracterizadas por una activación inapropiada de las células inmunitarias y que pueden ser tratadas o prevenidas mediante los usos descritos en el presente documento pueden clasificarse, por ejemplo, mediante el o los tipos de reacciones de hipersensibilidad subyacentes al trastorno. Estas reacciones normalmente se clasifican en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citolíticas), reacciones del complejo inmune o reacciones de inmunidad mediada por células (CMI) (también conocidas como reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)). (Véase, por ej., *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., Raven Press, N. Y., 3ª ed. 1993)).

[0179] Ejemplos específicos de tales enfermedades inmunológicas incluyen las siguientes: artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades desmielinizantes autoinmunes (por ej., esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal (por ej., enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, 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, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune femenina y masculina, 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 antifosfolípidos, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post cardiectomía, síndrome de Cushing, hepatitis autoinmune crónica activa, pulmón del pajarero, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción a la transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis de la temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Schönlein-Henoch, enfermedad injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenström, síndrome de Evans y disfunción gonadal autoinmune.

[0180] Por consiguiente, los usos descritos en el presente documento abarcan el tratamiento de trastornos de linfocitos B (por ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes de tipo I), linfocitos Th1 (por ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis o enfermedad injerto contra huésped), o linfocitos Th2 (por ej., dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópico, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica o enfermedad crónica de rechazo de injerto contra huésped). Generalmente, los trastornos relacionados con las células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th₁ o linfocitos Th₂.

[0181] En algunas 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 la CD70. Los agentes que se unen a anti-CD70 (por ej., anticuerpos o derivados) pueden administrarse para agotar dichas células T activadas que expresan la CD70. En una realización específica, la administración de anticuerpos anti-CD70 o derivados puede agotar las células T activadas que expresan la CD70, mientras que las células T en reposo no son sustancialmente agotadas por el anti-CD70 o derivado. En este contexto, "no agotada sustancialmente" significa que

menos del 60 % aproximadamente, o menos del 70 % aproximadamente o menos del 80 % aproximadamente de las células T en reposo no son agotadas.

5 [0182] Los agentes que se unen a anti-CD70 (por ej., anticuerpos y derivados) también son útiles para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer que expresa la CD70. El tratamiento o la prevención de un cáncer que expresa la CD70, según los métodos descritos en el presente documento, se logra mediante la administración, a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento o prevención, de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD70 o derivado, por la que el anticuerpo o derivado (i) se une a las células cancerosas que expresan la CD70 y (ii) ejerce un efecto citotóxico o citostático para agotar o inhibir la proliferación de las células cancerosas que expresan la CD70. En algunas realizaciones, el efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce sin conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. En algunas realizaciones, el efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce mediante la conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador.

10 [0183] Los cánceres que expresan la CD70 que pueden tratarse o prevenirse mediante los usos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, diferentes subtipos de Linfoma No Hodgkiniano (NHL indolentes, NHL foliculares, linfomas linfocíticos pequeños, NHL linfoplasmocíticos o NHL de zona marginal); enfermedad de Hodgkin (por ej., células de Reed-Sternberg); cánceres del linaje de células B, incluidos, por ej., linfomas difusos de células B grandes, linfomas foliculares, linfoma de Burkitt, linfomas de células de manto, leucemias linfáticas de células B (por ej., leucemia linfática aguda, leucemia linfática crónica); linfomas de células B positivos asociados al Virus de Epstein Barr; carcinomas de células renales (por ej., de tipo de células claras y papilar); carcinomas nasofaríngeos; carcinomas tímicos; gliomas; glioblastomas; neuroblastomas; astrocitomas; meningiomas; macroglobulema de Waldenstrom; mielomas múltiples; y carcinomas de colon, estómago y rectales. El cáncer puede ser, por ejemplo, recién diagnosticado, pretratado o refractario o recurrente. En algunas realizaciones, un cáncer que expresa la CD70 tiene al menos unas 15.000, al menos unas 10.000 o al menos unas 5.000 moléculas CD70/célula.

VIII. Composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD70 y derivados y administración de las mismas

25 [0184] Una composición que comprende un agente que se une a la CD70 (por ej., un anticuerpo anti-CD70 o derivado) conforme a las reivindicaciones puede administrarse a un sujeto que tiene o presenta riesgo de padecer un trastorno inmunológico o un cáncer de expresión CD70. La invención también contempla el uso de un agente que se une a la CD70 (por ej., un anticuerpo anti-CD70 o derivado) en la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o tratamiento de un cáncer que expresa la CD70 o trastorno inmunológico. El término "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier paciente mamífero al que se puede administrar un agente de unión a la CD70 incluyendo, por ej., mamíferos humanos y no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los sujetos previstos específicamente para el tratamiento mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento incluyen humanos. Los anticuerpos o derivados pueden administrarse por sí solos o en combinación con otras composiciones para la prevención o tratamiento del trastorno inmunológico o cáncer que expresa la CD70.

30 [0185] Se conocen diversos sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar el agente de unión a la CD70. Los métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El agente de unión a la CD70 se puede administrar, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo (por ej., intravenosa o subcutánea), mediante la absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, y similares), y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local.

40 [0186] En realizaciones específicas, la composición del agente de unión a la CD70 se administra mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye una membrana, tal como una membrana Sikalastic, o una fibra. Normalmente, cuando se administra la composición, se utilizan materiales en los que no se absorbe el agente que se une al anti-CD70.

45 [0187] En otras realizaciones, el agente que se une a anti-CD70 se administra en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede utilizarse 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, J. Engl. J. Med. 321 :574). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos. (Véase Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger y Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61. Véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). Se detallan otros sistemas de liberación controlada, por ejemplo, en Langer, citado anteriormente.

[0188] Un agente de unión a la CD70 (por ej., un anticuerpo anti-CD70 o derivado) puede administrarse en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del agente de unión y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica normalmente incluye uno o más vehículos farmacéuticos (por ej., líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos obtenidos del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y análogos). El agua es el vehículo más corriente cuando la composición farmacéutica se administra de manera intravenosa. También pueden utilizarse 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, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y análogos. Si se desea, la composición también puede contener 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 controlada, y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos habituales tales como los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína, normalmente en forma purificada, junto con una cantidad de vehículo adecuada para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Las formulaciones se corresponden con el modo de administración.

[0189] En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para una administración intravenosa son disoluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando resulte necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaina, para mitigar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosis 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 una 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 su administración.

[0190] Además, la composición farmacéutica se puede proporcionar en forma de un equipo farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un agente que se une a la CD70 (por ej., un anticuerpo anti-CD70 o derivado) 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 utilizar para la reconstitución o la dilución del anticuerpo anti-CD70 o derivado liofilizado. Opcionalmente, al recipiente o recipientes se les puede asociar una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, el uso o la comercialización de productos farmacéuticos o biológicos, cuya nota refleja la aprobación por parte de la agencia para la fabricación, uso o comercialización para la administración a seres humanos.

[0191] La cantidad de agente de unión a la CD70 (por ej., anticuerpo anti-CD70 o derivado) eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno inmunológico o cáncer que expresa la CD70 se puede determinar mediante técnicas clínicas habituales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los rangos óptimos de dosis. La dosis exacta a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración y de la fase del trastorno inmunológico o cáncer que expresa la CD70, y se debería decidir según el juicio del médico que aplica el tratamiento y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o con modelos animales.

[0192] Por ejemplo, la toxicidad y la eficacia terapéutica del anticuerpo anti-CD70 o derivado se puede determinar en cultivos celulares o en animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos habituales para la 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 agentes de unión a la CD70 (por ej., anticuerpos anti-CD70 o derivados) que presentan unos índices terapéuticos elevados. Cuando un agente que se une a la CD70 presenta efectos secundarios tóxicos, puede utilizarse un sistema de administración que dirija el agente de unión a la CD70 al lugar del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células que no expresan la CD70 y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

[0193] Los datos obtenidos a partir de los ensayos con cultivos celulares y de los estudios con animales pueden utilizarse en la formulación de un rango de dosis para su uso en seres humanos. La dosis del agente de unión a la CD70 está generalmente en un rango de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosis empleada y de la vía de administración utilizada. Para un agente de unión a la CD70 utilizado en el método, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar un rango de concentraciones plasmáticas circulantes que incluye la CI_{50} (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 puede utilizarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

[0194] Generalmente, la dosis de anticuerpo anti-CD70 o derivado administrado a un paciente con trastorno inmunológico o cáncer que expresa la CD70 es aproximadamente de entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg del peso corporal del sujeto. Más frecuentemente, la dosis administrada a un sujeto es de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg del peso corporal del sujeto, aún con mayor frecuencia de 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 12 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg o 1 mg/kg a 7,5 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 inmunitaria hacia las proteínas extrañas. Así, a menudo son posibles dosis menores de anticuerpo anti-CD70 o derivado que comprenden anticuerpos humanizados o quiméricos y una administración menos frecuente.

[0195] Una dosis de un agente de unión a anti-CD70 puede administrarse, por ejemplo, a diario, una vez a la semana (semanalmente), dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, cada dos semanas, mensualmente o de cualquier otra manera según se necesite.

[0196] En la divulgación, la dosis de un agente que se une a anti-CD70 corresponde a una dosis subóptima (a saber, por debajo de la CE_{50} para el agente de unión a anti-CD70 (por ej., un conjugado anticuerpo-fármaco). Por ejemplo, la dosis de un agente que se une a anti-CD70 puede comprender una dosis seleccionada del 25 % más bajo, del 15 % más bajo, del 10 % más bajo o del 5 % más bajo de la ventana terapéutica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ventana terapéutica" se refiere al rango de dosis de un fármaco o de su concentración en un sistema corporal que proporciona una terapia segura y efectiva.

[0197] En la divulgación, la dosis de un agente que se une a anti-CD70 (por ej., un conjugado anticuerpo-fármaco) es de aproximadamente 0,05 mg/kg a 1 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a 0,9 mg/kg, o de aproximadamente 0,15 a 0,75 mg/kg del peso corporal del sujeto. Tal dosis puede administrarse de 1 a aproximadamente 15 veces por semana. Cada dosis puede ser igual o diferente. Por ejemplo, una dosis de aproximadamente 0,15 mg/kg de un agente que se une a anti-CD70 puede administrarse de 1 a 10 veces por período de cuatro días, cinco días, seis días o siete días.

[0198] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a la CD70 también pueden comprender un agente terapéutico (por ej., un agente citotóxico o inmunomodulador no conjugado tal como, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento). El agente que se une a anti-CD70 también se puede co-administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan la CD70. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un agente terapéutico (por ej., un agente citostático, citotóxico o inmunomodulador, tal como un agente citostático, citotóxico o inmunomodulador sin conjugar como los utilizados habitualmente para el tratamiento de cánceres o de trastornos inmunológicos). La terapia de combinación también puede incluir, por ej., la administración de un agente que selecciona como objetivo un receptor o complejo de receptores distintos de la CD70 sobre la superficie de linfocitos activados, células dendríticas o células cancerosas que expresan la CD70. Un ejemplo de tal agente incluye 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 expresa la CD70. Otro ejemplo incluye un ligando que se dirige a tal receptor o complejo de receptores. En general, tal anticuerpo o ligando se une a un receptor de la superficie celular en linfocitos activados, células dendríticas o células cancerosas que expresan la CD70 y aumenta el efecto citotóxico o citostático del anticuerpo anti-CD70 mediante el envío de una señal citostática o citotóxica a los linfocitos activados, células dendríticas o células cancerosas que expresan la CD70. Tal administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (por ej., la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de las recurrencias).

[0199] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatoria, en una realización específica, un agente que se une a anti-CD70 se administra de manera concurrente con un agente terapéutico. En otra realización específica, el agente terapéutico se administra antes o después de la administración del anticuerpo anti-CD70 o derivado, 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 anticuerpo anti-CD70 o

derivado. En algunas realización, al sujeto se le supervisa tras la administración del agente que se une a anti-CD70, y opcionalmente del agente terapéutico.

5 [0200] El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, cualquier agente capaz de ejercer un efecto terapéutico en células cancerosas o células inmunitarias activadas. Normalmente, el agente terapéutico es un agente citotóxico o inmunomodulador. Tal administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (por ej., la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de las recurrencias).

10 [0201] Clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ej., complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirrolidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformantes, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a las radiaciones, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasas, alcaloides de la vinca, o análogos.

15 [0202] Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin (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 (actinomicina), daunorrubina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarrubina, ifosfamida, irinotecano, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalano, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, rapamicina (Sirolimus), estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecano, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

20

25 [0203] En algunas realizaciones típicas, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (por ej., enediínas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ej., paclitaxel y docetaxel), puromicinas, 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.

30 [0204] En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalano, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser una terapia combinada, tal como CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Prednisolona y Vincristina), CHOP-R (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisolona, y rituximab) o ABVD (Doxorrubicin, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbazina). Agentes tales como los análogos de CC-1065, calicheamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina pueden enlazarse a los anticuerpos anti-CD70 o derivados de los mismos.

35 [0205] En realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. En general, el derivado de auristatina E es, por ej., un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, a la auristatina E se le puede hacer reaccionar 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 Publicaciones de Solicitud de Patente Estadounidense N°. 20030083263 y 20050009751, la Solicitud de Patente Internacional N°. PCT/US03/24209, La Solicitud de Patente Internacional N°. PCT/US02/13435, y en las Patentes Estadounidenses N°. 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.

40

45 [0206] En realizaciones específicas, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ej., la Patente Estadounidense N°. 6.130.237). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediína (por ej., calicheamicina).

50 [0207] Ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, entre otros, taxanos (por ej., Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ej., vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), y dolastatinas (por ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ej., epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

[0208] En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

5 [0209] En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es ricina ni saporina.

[0210] En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un agente anti-VEGF, tal como AVASTIN (bevacizumab) o NEXAVAR (Sorafenib); un bloqueador del PDGF, tal como SUTENT (maleato de sunitinib); o un inhibidor de quinasas, tal como NEXAVAR (tosilato de sorafenib).

10 [0211] En algunas realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ej., azotioprina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ej., metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, foscarnet o trifluridina.

15 [0212] En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es tacrólimus, ciclosporina o rapamicina. En realizaciones adicionales, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoina, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoetina alfa, Denileucina difitox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, Epoetina alfa, estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, Interferon alfa-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, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoina, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

25 [0213] En realizaciones adicionales, el agente terapéutico es un anticuerpo, tal como 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); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart IDIO (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 and Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado); o un anticuerpo anti-CD40 (por ej., como el presentado en la Patente Estadounidense N° 6.838.261).

40 [0214] Otros anticuerpos adecuados incluyen, entre otros, los anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfa fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno prostático específico de membrana, 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, CD30, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P21, MPG, y el producto del oncogen Neu.

45 [0215] En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrólimus, ciclosporina, rapamicina, REVLIMID (lenalidomida), ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo o metotrexato. Alternativamente, el agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ej., Cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoides (por ej., prednisona o dexametasona).

50 [0216] En algunas realizaciones típicas, el agente inmunomodulador es un agente anti-inflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados del oxicam y derivados del ácido nicotínico. Clases de agentes anti-inflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de la 5-lipoxigenasa y antagonistas del receptor de leucotrienos. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es una citoquina, tal como G-CSF, GM-CSF o IL- 2.

[0217] Los inhibidores adecuados de la ciclooxigenasa incluyen el ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenac, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindaco, tenoxicam, tolmetin y ácido acetilsalicílico.

5 [0218] Los inhibidores apropiados de lipoxigenasa incluyen inhibidores de reducción de la oxidación (por ej., derivados del butano catecol, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalen, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no reductores de la oxidación (por ej., hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinometoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de inhibidores de reducción de la oxidación.

10 [0219] Otros inhibidores apropiados de lipoxigenasa incluyen antioxidantes (por ej., fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos de origen natural que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonoles, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, ortoaminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranoles, ebselen y especies que aumentan la actividad de la reducción de selenoenzimas), agentes quelantes del hierro (por ej., ácidos hidroxámicos y derivados de los mismos, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileutón, ácido 5-hidroxiantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ej., ketoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano.

15 [0220] Otros inhibidores adecuados más de lipoxigenasa incluyen inhibidores de eicosanoides (por ej., ácidos octadecatetraenoico, eicosadocosapentanoico, eicosahexaenoico y docosahexaenoico y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxiieicosatetraenoico, 15-monohidroxiieicosatrienoico y 15-monohidroxiieicosapentanoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfieren en los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamilo, fuscósida, curcumina, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapalen, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y di-(1-propenil)sulfuro.

20 [0221] Los antagonistas de los 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, 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, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SKandF- 104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

25 [0222] La invención se describe además en los ejemplos siguientes, que no pretenden limitar el alcance de la invención. Las líneas celulares descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en el cultivo según las condiciones especificadas por la American Type Culture Collection (ATCC) o Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ), o de cualquier otra forma conocida. Los reactivos del cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.

Ejemplo 1: Producción de variantes del anticuerpo anti-CD70 humanizado

30 [0223] Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino anti-CD70, 1F6, y una variante quimérica del 1F6, el c1F6, se muestran como SEC ID N°:1, 2, 21 y 22, respectivamente. (Véase también la Solicitud de Patente Estadounidense N°. 60/645.355, presentada el 19 de enero de 2005). Las secuencias aceptoras para la humanización del c1F6 se eligieron de las secuencias V_H, J_H, V_K y J_K de los exones de la línea germinal humana. Las secuencias aceptoras para la humanización del dominio V_H del c1F6 se seleccionaron de los exones V_H1-18 (Matsuda et al., 1993, Nature Genetics 3:88-94) o V_H1-2 (Shin et al., 1991, EMBO J. 10:3641-3645) para la V_H y del exón JH-6 para la J_H (Mattila et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25:2578-2582) de la línea germinal. Se seleccionaron el exón B3 para la V_K (Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836) y el exón J_K-1 para la J_K (Hieter et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522) de la línea germinal como secuencias aceptoras para la humanización del dominio V_L del c1F6. Las CDR murinas del 1F6, determinadas según la definición de Kabat, se injertaron en la plantilla de líneas germinales humanas elegida. En pocas palabras, se generaron oligonucleótidos sintéticos de solapamiento que abarcaban el dominio V_H o V_L humanizado y la extensión de solapamiento de la PCR se utilizó para agrupar cada dominio. Los sitios de restricción incorporados en el producto de la PCR se utilizaron para clonar direccionalmente el dominio V_H y V_L en un vector de expresión pCMV dentro del marco de lectura de los dominios constantes de la IgG1 humana o del dominio constante Kappa, respectivamente.

35 [0224] Se eligieron varias posiciones estructurales para la reintroducción de los residuos donadores de ratón. Estas fueron las posiciones H46, H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82, H82A y H91 del dominio VH, conforme a la convención de numeración de Kabat. No se alteró ninguna posición estructural del dominio V_L, si bien se eligieron los

residuos de la CDR1 de ratón de las posiciones L25 y L33 para la introducción del residuo aceptor humano para esa posición.

5 [0225] Se generaron varias variantes del 1F6 humanizado mediante la incorporación de distintas combinaciones de residuos donadores estructurales de ratón en el dominio V_H o residuos de la CDR humanos en el dominio V_L. Estas variantes se resumen en las Tablas 2 y 3 de abajo.

Tabla 2

Variante V _H	Secuencia aceptora de exones del V _H	Residuos donadores estructurales
hV _H A	VH1-18	H71,H91
hV _H B	VH1-18	H71
hV _H C	VH1-18	H91
hV _H D	VH1-18	ninguno
hV _H E	VH1-2	ninguno
hV _H F	VH1-18	H67, H68, H69, H70, H71
hV _H G	VH1-18	H80, H81, H82, H82A
hV _H H	VH1-18	H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82,H82A
hV _H I	VH1-18	H46,H71,H91
hV _H J	VH1-2	H46
hV _H K	VH1-2	H71
hV _H L	VH1-2	H46, H71
hV _H M	VH1-18	H46, H67, H68, H69, H70, H71
hV _H N	VH1-18	H69, H70, H71, H80

Tabla 3

Variante	Residuo de la CDR aceptor
V _L	
hV _L A	ninguno
hV _L B	L25
hV _L C	L33
hV _L D	L25, L33

10 [0226] En las Figuras 1 y 2 se ilustran las diferencias entre algunas de las variantes humanizadas con las secuencias de V_H murinas y humanas. En la Figura 1 se muestra un alineamiento de las variantes V_H del 1F6 humanizado hV_HE y hV_HJ con la mV_H del 1F6 y los exones V_H1-2 de la V_H y el exón JH6 de la J_H de la línea germinal humana. En la Figura 2 se muestra un alineamiento de las variantes V_H del 1F6 humanizado hV_HH y hV_HM con la

mV_H del 1F6 y los exones V_H1-18 de la V_H y el exón JH6 de la J_H de la línea germinal humana. En la Figura 3 se muestra un alineamiento de la variante V_L del 1F6 humanizado hV_{LA} con la mV_L del 1F6 y el exón B3 de la V_k y el exón JK-1 de la J_k de la línea germinal humana.

Ejemplo 2: Afinidades de unión de las variantes del 1F6 humanizado

5 [0227] Se seleccionaron las variantes del 1F6 humanizado HDLA (hV_{HD} y hV_{LA}), HHLA (hV_{HH} y hV_{LA}) y HJLA (hV_{HJ} y hV_{LA}), para la realización de un análisis de afinidad de unión. Se expresaron de manera transitoria un mg de cada anticuerpo humanizado y del c1F6 en 293 células y se marcaron con europio utilizando quelato yodoacetamido Eu-N1 Elmer). Se evaluó la unión por saturación a un panel de líneas celulares positivas de la CD70 de cada anticuerpo marcado. Las líneas celulares seleccionadas fueron las ACHN, Caki-2, Caki-1 y 786-0 con copias/células del antígeno determinadas mediante citometría de flujo cuantitativa (o clasificación de células activadas por fluorescencia, a saber, FACS) de 30.000, 99.000, 235.000 y 252.000, respectivamente.

10 [0228] Los anticuerpos marcados con europio se incubaron con células durante 1 hora a 4 °C a diferentes concentraciones en placas de 96 pocillos. Tras la incubación, el europio se liberó mediante la resuspensión de las células en Tampón de Amplificación (Perkin Elmer). La fluorescencia se leyó con un lector de placas Fusion HT utilizando un formato detector desde arriba, excitación de 335 nm y emisión de 620 nm. Los datos se trasladaron a una hipérbola de sitios de unión utilizando el programa GraphPad Prism 4. Los resultados se muestran más abajo en la Tabla 4.

Tabla 4

Línea celular	Antígeno/célula	Afinidad de unión aparente K_D (nM)			
		C1F6	HDLA del h1F6	HHLA del h1F6	HJLA del h1F6
ACHN	30.000	0,30	1,44	0,29	0,68
Caki-1	235.000	1,28	1,29	1,22	1,36
Caki-2	99.000	0,26	0,86	0,15	0,37
786-0	252.000	0,56	0,55	0,28	0,46

20 [0229] Los valores K_D de las variantes humanizadas son muy parecidos a los del c1F6 en todas las líneas celulares analizadas, lo que confirma que el proceso de humanización no redujo de manera significativa la actividad de unión al antígeno.

Ejemplo 3: Actividad ADCC del 1F6 humanizado

25 [0230] La capacidad de las variantes del anticuerpo 1F6 humanizado de mediar una ADCC contra las WIL2-S, 786-O y 769-P de las líneas celulares de la CD70⁺ se determinó a través de un ensayo de liberación de ⁵¹Cr habitual. Las variantes HHLA, HJLA y HELA del 1F6 humanizado lisaron las células diana WIL-2S de forma equivalente y de manera dependiente de la dosis. Por contra, las células tumorales tratadas con un 1F6 murino (m1F6) que se une a la CD70 o Ig humana (hIg) de control no aglutinante no fueron destruidas (Figura 4A). De manera similar, el 1F6 humanizado medió la lisis de dos dianas del carcinoma de células renales de manera comparable al 1F6 quimérico (Figura 4B).

Ejemplo 4: Actividad CDC del 1F6 humanizado

35 [0231] La capacidad del 1F6 humanizado de mediar una CDC se examinó utilizando una línea celular de mieloma múltiple (LP-1) y dos líneas celulares de linfoma (MHH PreB-1 y WIL2-S). Las células diana se trataron con dosis graduadas de 1F6 quimérico, la HJLA del 1F6 humanizado o una Ig humana de control no aglutinante en presencia de suero humano normal. Tras la incubación a 37 °C durante 2 horas, se identificaron las células lisadas mediante citometría de flujo tras la adición de yoduro de propidio (5 µg/mL). Se consideró que las células manchadas con yoduro de propidio habían perdido la integridad de la membrana plasmática como resultado de la activación del complemento mediada por el anticuerpo y la formación del complejo de ataque de la membrana. Mediante la utilización de este ensayo, el 1F6 quimérico y el 1F6 humanizado mediaron la lisis dependiente de la dosis de cada diana de una manera equivalente (Figura 5).

Ejemplo 5: Actividad ADCP del 1F6 humanizado

[0232] La capacidad del 1F6 humanizado de mediar la fagocitosis se examinó utilizando la línea de carcinoma de células renales de la CD70⁺ 786-O pre-marcada con un tinte de membrana rojo fluorescente. Las células diana se trataron con dosis graduadas de 1F6 quimérico, la HJLA del 1F6 humanizado o una Ig humana de control no aglutinante y se mezclaron con los macrófagos generados a partir de los monocitos de sangre periférica adherentes cultivados en GM-CSF. Tras la incubación a 37 °C durante 1 hora, se detectaron los macrófagos con un anticuerpo verde fluorescente contra el marcador de la superficie celular de los macrófagos CD11b. Se identificaron los macrófagos que tenían células tumorales fagocitadas a través de fluorescencia doble roja y verde según lo detectado mediante citometría de flujo. La presencia de células tumorales dentro de los macrófagos de la población doble positiva se confirmó mediante microscopía de fluorescencia. Tal como se muestra en la Figura 6, el 1F6 quimérico y el humanizado facilitaron la fagocitosis de las células diana de una manera dependiente de la dosis de anticuerpo y en un grado equivalente. Por el contrario, los macrófagos se fagocitaron mínimamente las células diana incubadas con un anticuerpo de control no aglutinante.

Ejemplo 6: Actividad de citotoxicidad in vitro de los conjugados variante del 1F6 humanizado-fármaco

[0233] Las variantes del 1F6 humanizado HELA (hV_HE y hV_LA), HHLA, HJLA y HMLA (hV_HM y hV_LA), y el c1F6 se expresaron de manera transitoria en 293 células y se conjugaron con vcMMAF (descrito en el n.º. de serie de los EE.UU. 10/983.340; publicado como Publicación de Patente Estadounidense N.º. 2005-0238649, 27 de octubre de 2005) a un nivel de carga de una media de ocho unidades de fármaco por anticuerpo. Se analizó la citotoxicidad de los conjugados resultantes, HELA h1F6-F8, HHLA h1F6-F8, HJLA h1F6-F8, HMLA h1F6-F8 c1F6-F8 en comparación con dos líneas celulares que expresan la CD70, la 786-O y la Caki-1. Los conjugados se incubaron con las células durante 92 horas, seguido de la adición de 50 µM de resazurina. Tras un período de incubación de 4 horas, se midió la reducción del tinte con un lector de placas fluorescentes Fusion HT (Packard Instruments, Meriden, CT). En la Tabla 5 de abajo se muestran los resultados de tres muestreos. Los valores CI₅₀ de las cuatro variantes humanizadas son activos en el doble de c1F6 en las dos líneas celulares analizadas con un rango de potencia de C1F6-F8 > HHLA h1F6-F8 > HMLA h1F6-F8 > HJLA h1F6-F8 > HELA h1F6-F8.

Tabla 5

H1F6-vcMMAF	N.º. de residuos de la FR de ratón	Caki-1 IC50 [ng/ml]	786-0 IC50 [ng/ml]
HELA h1F6-F8	0	3,4 (media = 2,87, n = 3)	5,2 (media = 3,9, n = 3)
HHLA h1F6-F8	9	1,4 (media = 1,87, n = 3)	2,3 (media = 1,93, n = 3)
HJLA h1F6-F8	1	2,2 (media = 2,3, n = 3)	3,4 (media = 3,03, n = 3)
HMLA h1F6-F8	6	1,8 (media = 2,07, n = 3)	2,8 (media = 2,03, n = 3)
c1F6(293)-F8	0	1,8 (media = 2,17, n = 3)	2,4 (media = 1,45, n = 3)

Ejemplo 7: Cribado in vivo de conjugados 1F6 humanizado-fármaco

[0234] Las variantes del 1F6 humanizado HDLA, HHLA, HJLA y HELA se expresaron de manera transitoria en 293 células y se conjugaron con mcMMAF (descrito en el n.º. de serie de los EE.UU. 10/983.340; publicado como Publicación de Patente Estadounidense N.º. 2005-0238649, 27 de octubre de 2005) a un nivel de carga de una media de ocho unidades de fármaco por anticuerpo. Se llevó a cabo un estudio de eficacia de una sola dosis a

3 mg/kg o 10 mg/kg en un modelo de tumor sólido de carcinoma de células renales 786-0 en ratones desnudos. El volumen del tumor se midió regularmente durante 80 días tras el implante del tumor. Los resultados indican que el volumen del tumor se redujo enormemente en todos los ratones tratados en comparación con los ratones no tratados, y la eficacia de todas las variantes del 1F6 humanizado conjugadas con mcMMAF fue comparable a la del c1F6-mcMMAF.

Ejemplo 8: Actividad in vivo del 1F6 humanizado en modelos xenógrafos de ratón SCID de linfoma diseminado y mieloma múltiple

[0235] Se examinó la actividad antitumoral in vivo del 1F6 humanizado (HJLA) en modelos xenógrafos de ratón de linfoma diseminado y mieloma múltiple. Para establecer la enfermedad diseminada, se inyectaron 1×10^6 células Raji o 1×10^7 células MM.1S o células L363 en la vena lateral de la cola de ratones C.B.-17 SCID. A los ratones se les administraron dosis de 1F6 humanizado (HJLA) o de anticuerpo no aglutinante de control por inyección intraperitoneal (i.p.) cada cuatro días durante un total de seis dosis (Raji) o por inyección intravenosa en la vena lateral de la cola una vez a la semana durante un total de cuatro semanas (MM.1S y L363) empezando un día después del implante celular. La enfermedad que requería eutanasia se manifestó por una postura encorvada y falta de acicalado, pérdida de peso, inflamación cerebral y parálisis de las extremidades posteriores, o, en los ratones con una carga de L363, el desarrollo de tumores palpables asociados al tejido linfóide.

[0236] Los resultados muestran que, en cada modelo de tumor (Figuras 7A, 7B y 7C), la supervivencia de los ratones tratados con 1F6 humanizado se prolongó significativamente en comparación con los ratones no tratados o con los ratones que recibieron un anticuerpo de control no aglutinante. El efecto del tratamiento con 1F6 humanizado se evaluó además en xenógrafos de mieloma múltiple (células L363 y MM.1S) a base de medir el nivel de proteína monoclonal derivada de tumores (cadena ligera λ) en los sueros de ratones individuales. Tal como se muestra en las Figuras 7B y 7C (paneles de la derecha), las concentraciones circulantes de la cadena ligera λ eran significativamente menores en los ratones tratados con el 1F6 humanizado en comparación con los ratones no tratados. Los niveles medios de suero de la cadena ligera λ en los ratones con una carga de L363 tratados con el 1F6 humanizado fueron de 0,006 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con los 0,10 $\mu\text{g/mL}$ de los sueros de los ratones no tratados. De forma similar, los niveles de la cadena ligera λ en los ratones con una carga de MM.1S tratados con el 1F6 humanizado fueron de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con los 1,25 $\mu\text{g/mL}$ de los ratones no tratados. Estos resultados coincidieron con las mayores tasas de supervivencia de los ratones (Figuras 7B y 7C, paneles de la derecha).

Ejemplo 9: Supresión in vitro de células T específicas al antígeno de la CD70^+ mediante un anticuerpo 1F6 humanizado

[0237] Para analizar la capacidad del anticuerpo 1F6 humano de agotar las células T activadas específicas al antígeno, se estimularon las PBMC de un donante normal que expresa HLA-A0201 con el péptido M1 en presencia o ausencia de distintas concentraciones de anticuerpo anti-CD70 humanizado. El anticuerpo 1F6 humanizado (HJLA) se preparó según lo descrito anteriormente. Se plantaron PBMC en una placa de 24 pocillos a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml con 5 $\mu\text{g/ml}$ de péptido M1 en 2 ml de medio complementado con IL-2 e IL-15. El día 5, se sustituyó la mitad del sobrenadante del cultivo por un medio nuevo que contenía citoquina. El día 9, se determinó el porcentaje de células reactivas al antígeno (la población $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$) mediante un análisis citométrico de flujo de las células manchadas con anticuerpos anti-V β 17 conjugados con FITC y anti-CD8 conjugados con PE-Cy5.

[0238] La Figura 8A muestra que las células $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ específicas al antígeno se expandieron hasta comprender el 33 % de todas las células viables del cultivo en ausencia de anticuerpo. Por el contrario, la adición de un 1F6 humanizado en los cultivos el día 0, limitó significativamente la expansión de la población reactiva al antígeno de una manera dependiente de la dosis de anticuerpo. Estos resultados muestran que el 1F6 humanizado selecciona como objetivo y previene la expansión de las células T activadas con el antígeno.

[0239] En un segundo estudio (Figura 8B), se trataron o no trataron cultivos estimulados con el péptido M1 con el 1F6 humanizado en ausencia o presencia de un anticuerpo que bloquea específicamente el Fc γ RIII (CD16). En los cultivos no tratados, la población de $\text{CD8}^+/\text{V}\beta 17^+$ específica al antígeno se expandió hasta comprender el 39 % de todas las células viables del cultivo. La adición del 1F6 humanizado redujo significativamente la expansión de la población reactiva. Esta actividad se invirtió en gran medida cuando los receptores Fc γ RIII se bloquearon con un anticuerpo anti-CD16 específico, lo que indica que la supresión de las células reactivas al péptido se vio mediada por la interacción del 1F6 humanizado con las células efectoras cargadas con el Fc γ RIII.

Ejemplo 10: El anticuerpo anti-CD70 no afecta a las células espectadoras negativas para el antígeno

[0240] Para determinar el efecto de la supresión mediada por el 1F6 sobre las células T espectadoras negativas para el antígeno, se examinó la representación de la familia V β del TCR de los linfocitos CD4 y CD8 en cultivos

activados con M1 que fueron tratados o no con una variante quimérica del 1F6 (c1F6) (isotipo IgG1 humano) y se comparó con las PBMC en reposo, no estimuladas por el antígeno. Las variantes quiméricas y humanizadas del 1F6 son comparables en cuanto a su afinidad de unión, su capacidad de mediar funciones efectoras y su capacidad de agotar subgrupos de células T CD8+ activadas.

5 [0241] Tal como se muestra en la Figura 9, la estimulación de las PBMC de un HLA-A0201⁺ con un péptido M1 causó la expansión de las células CD8⁺ cargadas con el Vβ17 TCR en aproximadamente 30 veces, mientras que el resto de las familias Vβ ensayadas en células CD8⁺ y todas las familias ensayadas en la población de células CD4 demostraron un cambio mínimo. En la población de control, la expansión celular se limitó al subgrupo Vβ17⁺CD8⁺ de la células T, que aumentó de <1 % de células CD8⁺ a un 27 %; esta observación confirma la especificidad de la respuesta inmunitaria al péptido M1. A diferencia de las células T estimuladas en ausencia del anticuerpo específico a la CD70, la expansión de las células CD8⁺ específicas al péptido M1 se evitó mediante la adición de un anticuerpo c1F6 en el cultivo. En presencia del anticuerpo c1F6, el porcentaje de células Vβ17⁺CD8⁺ fue comparable al de las células en reposo, no estimuladas por el péptido. El tratamiento con el anticuerpo c1F6 no perturbó significativamente las representaciones relativas de las otras familias Vβ CD8⁺ o CD4⁺ del TCR; no se observó la eliminación de ningún grupo. Estos datos demuestran que la exposición al anticuerpo c1F6 agota las células T activadas con la CD70⁺ sin causar daños colaterales detectables a las poblaciones de células T espectadoras.

Ejemplo 11: Modelo xenógrafo de carcinoma de células renales de ratón

[0242] Se utilizó un modelo xenógrafo subcutáneo 786-O para evaluar la actividad antitumoral de los ADC anti-CD70 administrados a diferentes dosis y protocolos. Se iniciaron tumores 786-0 subcutáneos en ratones desnudos mediante la implantación de fragmentos de tumores (N=5 ó 6/grupo) de 30 mm³ aproximadamente. Se dejó que se estableciera el crecimiento de los tumores y el tratamiento comenzó cuando el tamaño medio de los tumores llegó a 100 mm³ aproximadamente. Las dimensiones de los tumores se determinaron mediante mediciones realizadas con un calibre para controlar el crecimiento. El tamaño de los tumores se calculó utilizando la fórmula (longitud x anchura²)/2. En ausencia de tratamiento, el volumen medio de los tumores aumentó a 600 mm³ aproximadamente a los 40 a 50 días de la implantación de los tumores (véase la Figura 10A). Se observó un efecto dependiente de la dosis en la supresión del crecimiento de los tumores en los ratones que recibieron bien 1F6 humanizado-mcMMAF4 (HJLA con un nivel de carga de una media de cuatro unidades de fármaco por anticuerpo) 1F6 humanizado-VcMMAF4 (HJLA con un nivel de carga de una media de cuatro unidades de fármaco por anticuerpo). Se observó un retardo detectable en el crecimiento de los tumores incluso a 0,5 y 0,17 mg/kg de h1F6-mcMMAF4 y h1F6-vcMMAF4, respectivamente.

[0243] También se evaluó el crecimiento de los tumores en función del tiempo necesario para que los tumores cuadruplicaran su tamaño (véase la Figura 10B). El tratamiento bien con h1F6-mcMMAF4 o con h1F6-vcMMAF4 a 0,17 mg/kg retardó significativamente el crecimiento de los tumores. Este retardo se observó cuando los ADC fueron administrados según un protocolo de 1 dosis cada 4 días de 4 dosis totales (q4d x 4) o de 1 dosis cada cuatro días de 10 dosis totales (q4d x 10). No obstante, las administraciones adicionales como puede verse en el ejemplo del protocolo q4d x 10 parecieron tener una actividad inhibitora del crecimiento más fuerte en comparación con el protocolo q4d x 4.

Ejemplo 12: Expresión de la CD70 en líneas celulares de mieloma múltiple

[0244] La expresión de la CD70 en la superficie celular se evaluó en un panel de múltiples líneas celulares de mieloma (Tabla 6). El número de copias de las moléculas CD70 expresadas por cada línea celular se determinó mediante citometría de flujo cuantitativa utilizando el QIFIKit® (Dako, Carpinteria, CA). Se determinó la respuesta de estas células a la citotoxicidad mediada por el ADC anti-CD70. En este modelo, la actividad de los ADC anti-CD70 quiméricos es un indicador de la actividad de los ADC anti-CD70 humanos. Tanto el 1F6 quimérico (c1F6)-vcMMAF4 como el c1F6-mcMMAF4 fueron citotóxicos contra las células de mieloma múltiple que expresan la CD70. Los valores CI₅₀ obtenidos con el c1F6-vcMMAF4 oscilaron entre 1,2-160 ng/mL mientras que los obtenidos con el c1F6-mcMMAF4 oscilaron entre 1,7-500 ng/mL.

Tabla 6

Actividad citotóxica de los ADC anti-CD70 quiméricos contra las líneas celulares de mieloma múltiple

	CI ₅₀ (ng/mL)	
	Copias de CD70/célula	
	c1F6-vcMMAF4	c1F6-mcMMAF4
MM.1S	14.000	22

MM.1R	25.000	13	20
AMO-1	92.000	16	38
JJN-3	19.000	46	61
L363	13.000	78	210
LB	45.000	80	500
US26	155.000	1,2	1,7
LP-1	9.000	73	33

Ejemplo 13: Modelos xenógrafos de mieloma múltiple de ratón

[0245] También se examinó la actividad in vivo de los ADC anti-CD70 en modelos xenógrafos de mieloma múltiple. Las líneas celulares de mieloma múltiple humano MM-1S (Figuras 11A y 11B) o L363 (Figuras 12A y 12B) se resuspendieron en un medio RPMI-1640 a una concentración de 10×10^6 células/300 μ L. Para establecer tumores, se inyectaron por vía intravenosa a través de las venas de las colas de ratones SCID 300 μ L de suspensión celular. En el modelo MM-1S, los ratones no tratados sucumbieron a las células tumorales inyectadas y manifestaron síntomas a los 40 días de la implantación del tumor aproximadamente, entre los que cabe incluir parálisis en las extremidades posteriores, postura encorvada, inflamación cerebral y/o pelo andrajoso. Los ratones se sacrificaron cuando demostraron uno o más de estos síntomas. Tanto el h1F6(HJLA)-vcMMAF4 como el h1F6(HJLA)-mcMMAF4 proporcionaron unos beneficios de supervivencia significativos a los ratones con una carga de tumores en comparación con los que recibieron IgG de control no aglutinante-vcMMAF4 e IgG-mcMMAF4 (véase la Figura 11A). También se evaluó la carga tumoral en el modelo MM-1S mediante la enumeración del número de células de la médula ósea que expresaban la CD138 humana, un marcador de células plasmáticas expresado por las células MM-1S. Las células de la médula espinal se recuperaron de los ratones que habían sido sacrificados por una manifestación de síntomas o al final del experimento el día 122, y el número de células de MM-1S que expresan CD138 se determinó mediante citometría de flujo. En comparación con los ratones no tratados, ni el IgG control-vcMMAF4 ni el IgG-mcMMAF4 redujeron significativamente el número de células que expresan CD138 en la médula espinal. Por otro lado, el h1F6-vcMMAF4 y el h1F6-mcMMAF4 redujeron significativamente la carga tumoral tal como quedó demostrado por un número mucho menor de células que expresan CD138 en la médula espinal en comparación con los ADC de control (véase la Figura 11B).

[0246] En el modelo L363, se desarrollaron masas tumorales diseminadas en múltiples lugares en los ratones que no recibieron tratamiento y las masas tumorales se hicieron palpables a los 40 días de la inyección de los tumores aproximadamente, en los que se sacrificarían los ratones con carga tumoral. De forma similar al modelo MM-1S, el IgG control-vcMMAF4 no proporcionó ninguna ventaja para la supervivencia, mientras que el h1F6-vcMMAF4 prolongó significativamente la supervivencia (véase la Figura 12A). Dado que la cadena ligera lambda (LC λ) de la inmunoglobulina secreta células L363, la carga tumoral puede determinarse controlando el nivel de LC λ humana en el plasma de los ratones con la carga tumoral. Para detectar la LC λ secretada se utilizó un ELISA. Se revistieron inmunoplasmas de fondo plano y noventa y seis pocillos (Nunc Maxisorp, n°. 442404, Nalge Nunc International, Rochester, NY) con 100 μ L/pocillo de Ig anti-humana de cabra (Southern Biotech n°. 2010-01, Birmingham, AL) a 2 μ g/mL en 0,1 M de carbonato/bicarbonato sódico y se dejaron toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron 5 veces con 1X PBST (PBS, Tween-20 al 0,05 %), y se bloquearon con 200 μ L/pocillo de BSA/PBST al 1 % (Tween-20 al 0,05 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 5 lavados con 1X PBST, se añadieron muestras séricas de ratón que contenían la LC λ altamente diluida. Se utilizó la LC λ humana purificada (Bethyl labs, n°. P80-127, Montgomery, TX) como estándar. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 5 veces con 1X PBST. Se añadió HRP-F(ab')₂ específica a la cadena lambda anti-humana de cabra (Southern Biotech n°. 2072-05) a una dilución 1:4000 en BSA/PBST al 1 %. Tras una hora más de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 5 veces con 1X PBST. Se utilizaron 100 μ L/pocillo de sustrato TMB (Sigma, n°. T8665, St. Louis, MO) para detectar la LC λ capturada. La Figura 12B muestra los resultados a los cuarenta días tras el implante de las células L363 y los niveles de LC λ en el suero fueron comparables entre los ratones no tratados y los ratones tratados con el IgG-vcMMAF4. Por el contrario, los niveles de LC λ en el suero de los ratones tratados con el h1F6-vcMMAF4 fueron significativamente menores, lo que confirma la capacidad del ADC anti-CD70 de reducir la carga tumoral en ratones portadores de xenógrafos de mieloma múltiple.

Ejemplo 14: Expresión de CD70 en líneas celulares de Hodgkin y de glioblastoma

[0247] La expresión de la CD70 en la superficie celular también se evaluó en paneles de líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin (Tabla 7) de glioblastoma (Tabla 8). El número de copias de las moléculas CD70 expresadas por cada línea celular se determinó mediante citometría de flujo cuantitativa utilizando el QIFIKit® (Dako, Carpintería, CA). Se determinó la respuesta de estas células a la citotoxicidad mediada por el ADC anti-CD70 quimérico. En este modelo, la actividad de los ADC anti-CD70 quiméricos es un indicador de la actividad de los ADC anti-CD70 humanos. Tanto el 1F6 quimérico (c1F6)-vcMMAF4 como el c1F6-mcMMAF4 fueron citotóxicos contra estas líneas celulares que expresan la CD70. En el panel de la enfermedad de Hodgkin, los valores CI₅₀ obtenidos con el c1F6-vcMMAF4 oscilaron entre 0,41-42 ng/mL mientras que los obtenidos con el c1F6-mcMMAF4 oscilaron entre 5,2-310 ng/mL (Tabla 7). En el panel del glioblastoma, los valores CI₅₀ obtenidos con el h1F6-vcMMAF4 oscilaron entre 2,3-27 ng/mL mientras que los obtenidos con el h1F6-mcMMAF4 oscilaron entre 15-110 ng/mL (Tabla 8).

Tabla 7

Actividad citotóxica de los ADC anti-CD70 contra las líneas celulares de la enfermedad de Hodgkin

CI₅₀ (ng/mL)

15	Copias de CD70/célula	c1F6-vcMMAF4	c1F6-mcMMAF4	
	RPMI-6666	21.000	42	230
	Hs445	64.000	7,3	310
	L428	105.000	1,4	35
	KMH2	160.000	0,41	5,2
	SUP-HD-1	221.000	6,3	53

Tabla 8

Actividad citotóxica de los ADC anti-CD70 quiméricos contra las líneas celulares glioblastoma

CI₅₀ (ng/mL)

20	Copias de CD70/célula	h1F6-vcMMAF4	h1F6-mcMMAF4	
	U251	117,00	5,3	15
	SNB- 19	90.000	12	27
	U373MG	70.000	16	35
	GMS-10	64.000	27	110
25	DBTRG-05MG	59.000	2,3	20

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Seattle Genetics, Inc.
McDonagh, Charlotte
Carter, Paul
McEarchern, Julie
Law, Che-Leung

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD70 HUMANIZADOS Y USOS DE LOS MISMOS

ES 2 477 765 T3

<130> 018891-001600PC

<150> US 60/673.070

<151> 19-04-2005

<160> 30

5

<170> Patente Internacional version 3.3

<210> 1

<211> 411

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 1

atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

atccagttgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggcct ctgggtatac cttcacaaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180

ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240

gatgccttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300

cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag agactacggc 360

gactatggta tggactactg gggcaagga acctcagtca ccgtctcctc a 411

<210> 2

15 <211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 477 765 T3

<400> 2

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

5 <211> 1404

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana en el dominio HV

ES 2 477 765 T3

<400> 3

atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaagtgc ccaagcacag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc 120

ES 2 477 765 T3

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct 180
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240
 gatgccttca agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcac agcctacatg 300
 gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag agactacggc 360
 gactatggta tggactactg ggtcaagga accaccgtca ccgtctcctc agctagcacc 420
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tctggggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtataa cagcacgtac 960
 cgtgtggta cgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccaggta gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 4

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> CDR murina, FR humana en el dominio HV

ES 2 477 765 T3

<400> 4

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

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu 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 Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

ES 2 477 765 T3

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

ES 2 477 765 T3

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 5

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana

<400> 5

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacct aactggaga gccaacatat 180
 gctgatgcct tcaagggcag agtcaccatg accagagaca catccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300
 ggcgactatg gtatggacta ctggggtcaa ggaaccaccg tcaccgtctc ctca 354

ES 2 477 765 T3

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 7

ES 2 477 765 T3

<211> 1404

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> CDR murina, FR humana en el dominio HV

<400> 7

atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240

ES 2 477 765 T3

gatgccttca agggcagagt caccatgacc agagacacat ccatcagcac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag agactacggc 360
gactatggta tggactactg gggtaagga accaccgtca cagtctctc agctagcacc 420
aagggccat cgtcttccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc 660
aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
tgctgtgtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
cgtgtgttca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
aaccaggctc gcctgacctg cctgggcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 8

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana en el dominio HV

ES 2 477 765 T3

<400> 8

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

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu 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 Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

ES 2 477 765 T3

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

ES 2 477 765 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 9

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

<400> 9

caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacct aactggaga gccaacatat 180

gctgatgcct tcaagggcag atttgccttc tctttggaca catccacgag cacagcctac 240

ttgcagatca acagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300

ggcgactatg gtagggacta ctgggggtcaa ggaaccaccg tcaccgtctc ctca 354

<210> 10

10 <211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 477 765 T3

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

<400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 11

<211> 1404

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 11

atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggttacac cttaccaac tatggaatga actgggtgcg acaggccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240

gatgccttca agggcagatt tgccttctct ttggacacat ccacgagcac agcctacttg 300

ES 2 477 765 T3

cagatcaaca gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agactacggc 360
 gactatggta tggactactg gggtaagga accaccgtca ccgtctctc agctagcacc 420
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 12

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 12

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

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu 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 Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

ES 2 477 765 T3

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

ES 2 477 765 T3

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 13

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

<400> 13

caggttcagc tggtagcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttaagtg gatgggatgg atcaacacct aactggaga gccaacatat 180

gctgatgcct tcaagggcag agtcaccatg accagagaca catccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300

ggcgactatg gtatggacta ctgggggtcaa ggaaccaccg tcaccgtctc ctca 354

10 <210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

 35 40 45

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

 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

 115

5

<210> 15

<211> 1404

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 15

atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggttacac cttaccaac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttaagtggat gggatggatc aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240
gatgccttca agggcagagt caccatgacc agagacacat ccatcagcac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag agactacggc 360
gactatggta tggactactg gggtaagga accaccgtca ccgtctcctc agctagcacc 420

ES 2 477 765 T3

aagggccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480

gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cgggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtata cagcacgtac 960

cgtgtggta gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctgggtaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 1260

gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 16

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

ES 2 477 765 T3

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

<400> 16

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

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln 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 Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

ES 2 477 765 T3

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 17

5 <211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

<400> 17

caggttcagc tggtagcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttaagtg gatgggatgg atcaacacct aactggaga gccaacatat 180

gctgatgcct tcaagggcag atttgccttc tctttggaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300

ggcgactatg gtatggacta ctgggggtcaa ggaaccaccg tcaccgtctc ctca 354

10

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 1404

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 19

atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag	60
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc	120
tgcaaggctt ctggttacac ctttacc ^a aac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct	180
ggacaagggc ttaagtggat gggatggatc aacacctaca ctggagagcc aacatatgct	240
gatgccttca agggcagatt tgccttctct ttggacacat ccacgagcac agcctacatg	300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag agactacggc	360
gactatggta tggactactg gggtaagga accaccgtca ccgtctcctc agctagcacc	420
aagggcccat cggctctccc cctggcacc ^c tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	480

ES 2 477 765 T3

gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 .
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 600
 .
 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 .
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 .
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 .
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 .
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 .
 ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 .
 cgtgtgggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 .
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacatctc caagccaaa 1080
 .
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 .
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 .
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 1260
 .
 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 .
 aacgttttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 .
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 20

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, residuos murinos en la FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 20

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

ES 2 477 765 T3

1	5	10	15
Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	20	25	30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	35	40	45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	50	55	60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala	65	70	75
Asp Ala Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser	85	90	95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly	115	120	125
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	130	135	140
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	145	150	155
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	165	170	175
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	180	185	190
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	195	200	205
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	210	215	220
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	225	230	235
			240

ES 2 477 765 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 21

<211> 396

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 21

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacattgtgc tgacacagtc tcttgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120

atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcactggtat 180

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 240

ggggtcctg ccaggttcag tggcagtggg totgggacag acttcaccct caacatccat 300

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ggttccgtgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgg 396

<210> 22

<211> 132

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

ES 2 477 765 T3

<400> 22

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> 23

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 477 765 T3

<220>

<223> CDR murina, FR humana

<400> 23

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacc ttgcatcaa cctagaatcc 180

ggggtcccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc acagtaggga ggttccgtgg 300

acgttcggtc agggcaccaa ggtggaaatc aaacgt 336

<210> 24

5 <211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 25

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 25

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggg 60
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120
atcaactgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcaactggtag 180
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacc ttgcatcaa cctagaatcc 240
ggggtcctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttactct caccatcagc 300
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc acagtaggga ggttccgtgg 360
acgttcggtc agggcaccaa ggtggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctggtgt gtgectgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
accatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtag 717

<210> 26

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR murina, FR humana

ES 2 477 765 T3

<400> 26

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 Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn 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 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

ES 2 477 765 T3

Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 27

<211> 411

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

ES 2 477 765 T3

<400> 27

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

<210> 28

<211> 137

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 477 765 T3

<400> 28

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

<210> 29

<211> 396

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

ES 2 477 765 T3

<400> 29

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttaactgtat ctctggggca gaagaccacc 120

atctcatgca gggccagcaa gagtgtcagt acatctggct atagttttat gcactggtag 180

caactgaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc ttgctgcaa cctaccatct 240

gggtccctg ccagggtcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caaaatccat 300

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gattccgtac 360

acgttcggag gggggaccaa gctggaata acacgg 396

<210> 30

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 477 765 T3

<400> 30

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la CD70 humana, que comprende una región variable de cadena pesada humanizada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°:6, SEC ID N°: 14 o los aminoácidos 20-137 de la SEC ID N°:4 y una región variable de la cadena ligera humanizada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 24,
- 5 en donde la región variable de la cadena pesada comprende las CDR de Kabat de la SEC ID N°:2 y la región variable de la cadena ligera comprende las CDR de Kabat de la SEC ID N°:22,
- 10 en donde el anticuerpo del fragmento de unión al antígeno del mismo se une a la CD70 con una constante de disociación (Kd) inferior a 10^{-9} M.
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:6, SEC ID N°: 14, o los aminoácidos 20-137 de la SEC ID N°:4, y la región variable de la cadena ligera comprende la SEC ID N°:24.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 2, que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 2, en donde la cadena ligera humanizada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:26.
5. El fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, que es un scFv, diacuerpo, Fab, minicuerpo o scFv-Fc.
- 20 6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 2, que comprende un dominio efector de anticuerpo, preferentemente humano, opcionalmente, un dominio efector de anticuerpo que media una ADCC, ADCP o CDC.
7. El anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo del mismo de la reivindicación 6, en donde el dominio efector de anticuerpo es un dominio efector de anticuerpo humano.
- 25 8. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un agente terapéutico.
9. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 8, en donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, opcionalmente MMAE o MMAF.
10. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 8, en donde el agente terapéutico es un agente inmunomodulador.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y al menos un ingrediente farmacéuticamente compatible.
12. Un par de vectores aislados que codifican la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los vectores están para su co-expresión en una célula hospedadora.
- 35 13. Los vectores aislados de la reivindicación 12, en donde los vectores comprenden las secuencias de polinucleótidos de la SEC ID N°: 13 y la SEC ID N°: 23, respectivamente.
14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto humano con cáncer que expresa la CD70.
- 40 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa la CD70 o un trastorno inmunológico en un sujeto humano en donde el trastorno inmunológico es artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades desmielinizantes autoinmunes, oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis
- 45

5 lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia arcata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia (síndrome de CREST), infertilidad autoinmune femenina y masculina, 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 antifosfolípidos, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post cardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis autoinmune crónica activa, pulmón del pajarero, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción a la transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis de la temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmiелitis, eritema *elevatum et diutinum*, psoriasis, eritroblastosis fetal, fasciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Schönlein-Henoch, enfermedad injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenström, síndrome de Evans y disfunción gonadal autoinmune; en donde preferentemente, la enfermedad desmielinativa autoinmune es esclerosis múltiple o encefalomiелitis alérgica, y en donde preferentemente la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn.

16. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en terapia.

25

Fig 1

					46	
1F6 mV _H	(1)	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASG	YTF	TNYGMN	WVVKQAPGKGLKWMGW	
1F6 hV _H E	(1)	.V.....A.....AS..V.....R.....Q..E.....	
1F6 hV _H J	(1)	.V.....A.....AS..V.....R.....Q..K.....	
V _H 1-2	(1)	.V.....A.....AS..V.....	G.Y.ER.....Q..E.....	^ ^ ^
1F6 mV _H	(51)	INTYTGEP	TYADAFKGRFAFSLETSASTAYLQ	INN	LKNEDTATYFCARDY	
1F6 hV _H E	(51)VTMRD..I.....MELSR.RSD...V..Y.....	
1F6 hV _H J	(51)VTMRD..I.....MELSR.RSD...V..Y.....	
V _H 1-2	(51)	.PNS.GTN..QKFQ..	VTMRD..I.....MELSR.RSD...	V..Y.....Y..	^ ^
1F6 mV _H	(171)	G	DYGM	YWG	Q	GTSVTVSS
1F6 hV _H E	(171)T.....
1F6 hV _H J	(171)T.....
J _H 6		YY.....V.....T.....				

Fig 2

46 |

1F6 mV _H	(1)	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMMNVVKQAPGKGLKWMGW
1F6 hV _H H	(1)	.V.....A.....AS.V.....R.....Q..E.....
1F6 hV _H M	(1)	.V.....A.....AS.V.....R.....Q..K.....
V _H 1-18	(1)	.V.....A.....AS.V.....S..IS.....R.....Q..E.....

1F6 mV _H	(51)	INTYTGEPYADAFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNEDTATYFCARDY
1F6 hV _H H	(51)FAFSLD..T.....LOINS.RSD...V.Y.....
1F6 hV _H M	(51)FAFSLD..T.....MELRS.RSD...V.Y.....
V _H 1-18	(51)	.SA.N.NFN..QKLO..VTMTD..T.....MELRS.RSD...V.Y.....

1F6 mV _H	(101)	G DY G M D Y W G Q G T S V T V S S
1F6 hV _H H	(101)T.....
1F6 hV _H M	(101)T.....
JH6		YY.....V.....T.....

Fig 3

1F6 mVL	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	<u>KSVSTSG--YSEMHWYQQKPGQPP</u>
1F6 hVLA	(1)	...M...D...E...N...
B3	(1)	...M...D...E...N...KS.Q..LY.SNNKNYLA ^ ^ ^
1F6 mVL	(49)	KLLIYLASNL	<u>ESGVPARFSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREV</u>
1F6 hVLA	(49)D.....T.SSLQA..V.V.....
B3	(51)	...W...TR.....D.....T.SSLQA..V.V..... QYYST ^
1F6 mVL	(99)	<u>PWTF</u>	<u>FGGGTKLEIKR</u>
1F6 hVLA	(99)Q...V....
B3/JK-1	(101)Q...V....

FIG. 4A

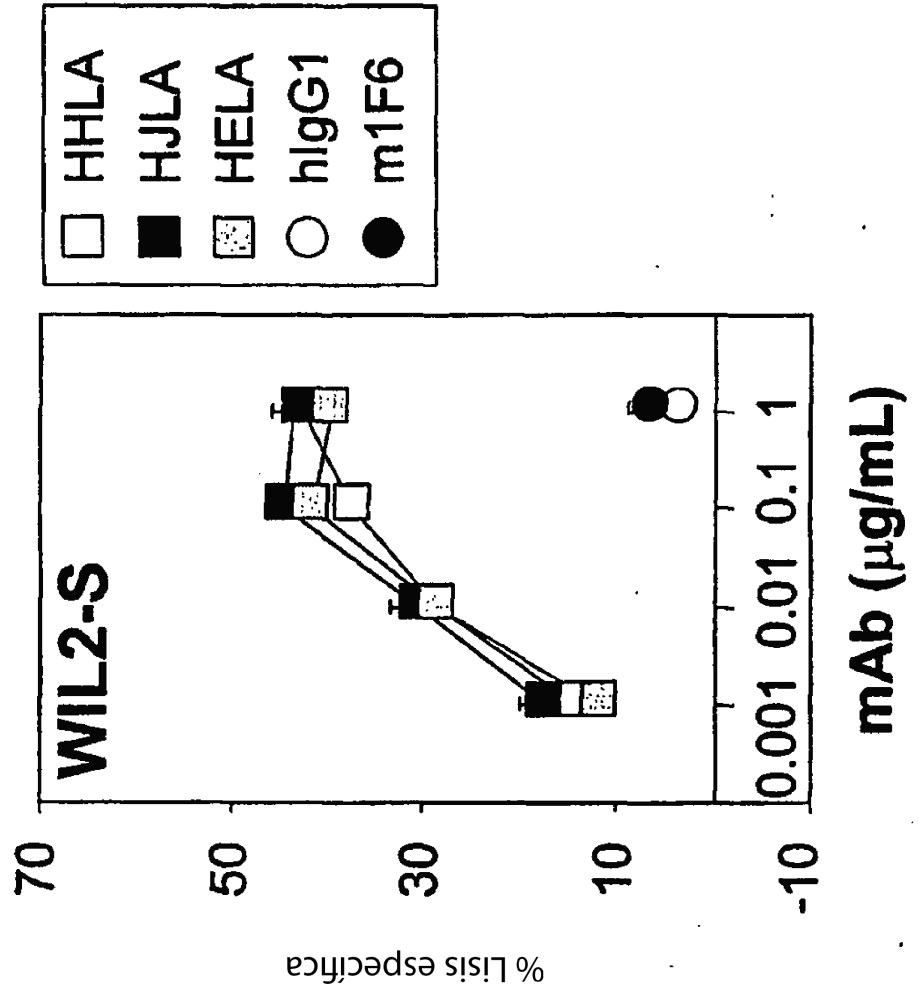
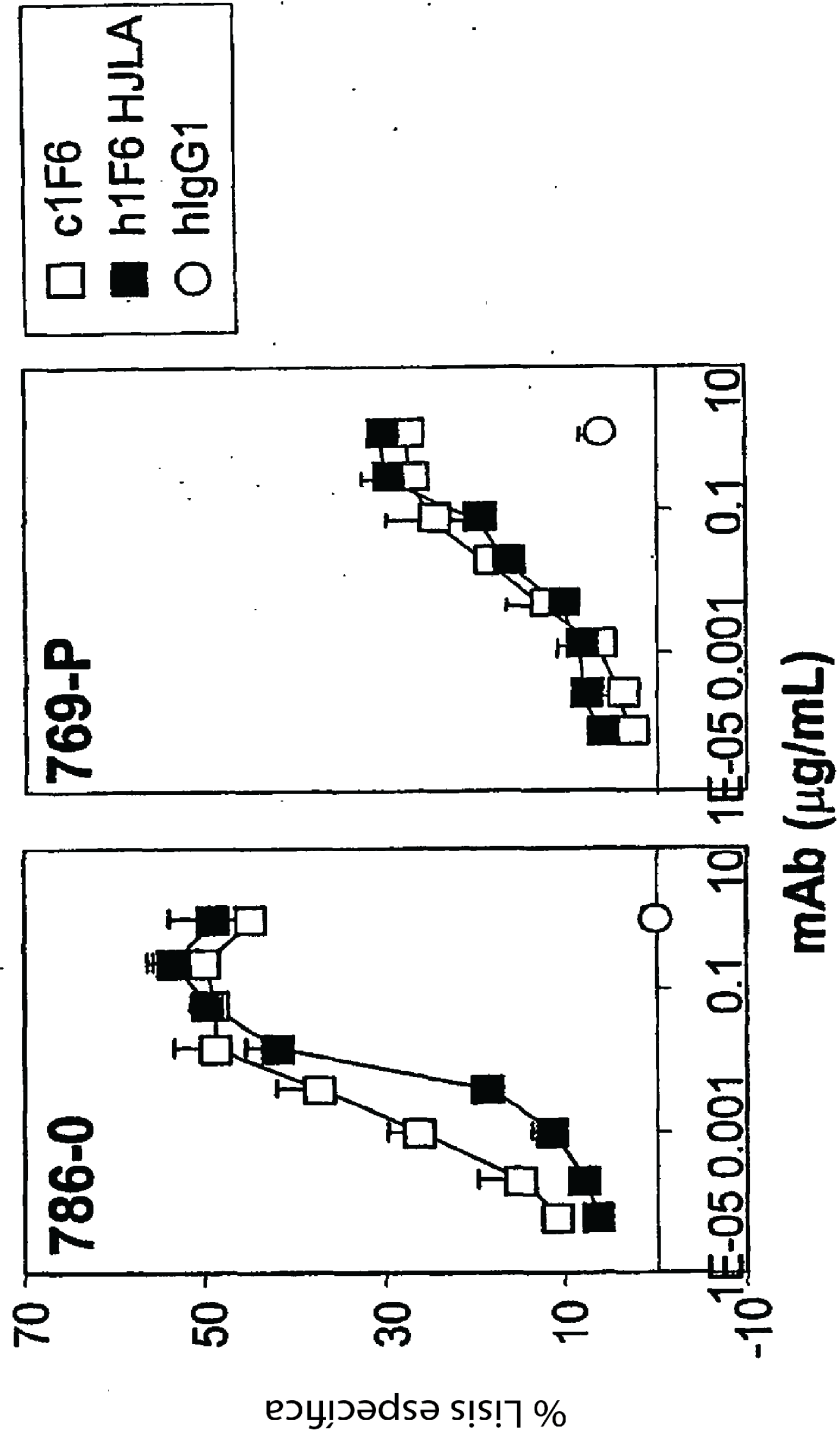


Fig 4B



Fig| 5

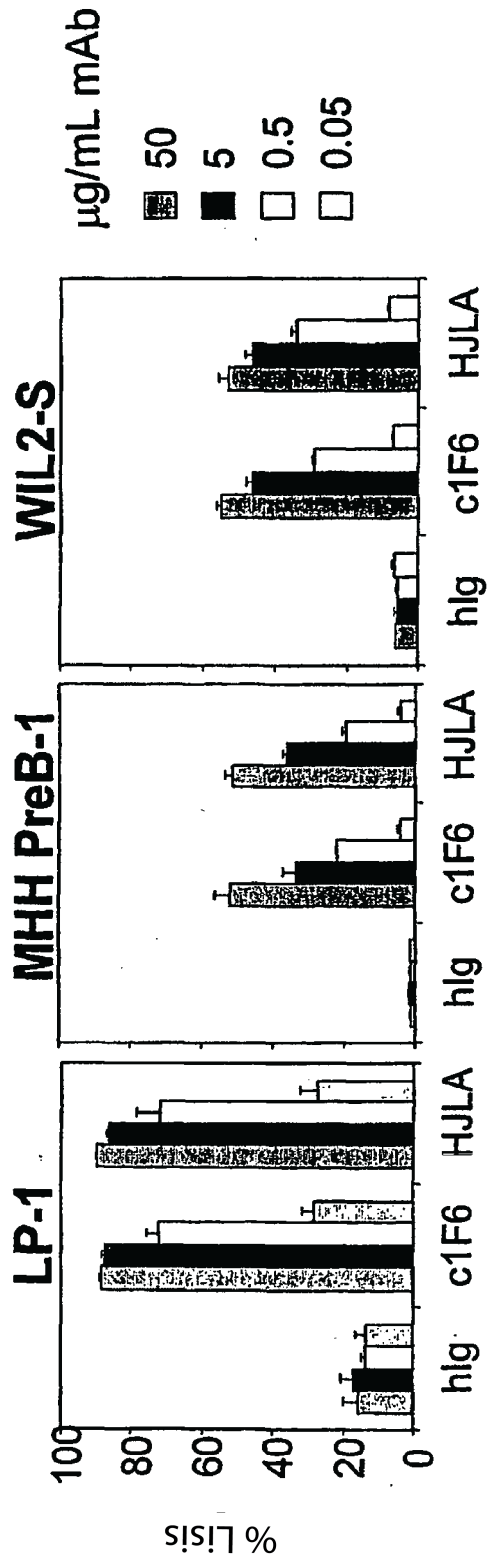


Fig 6

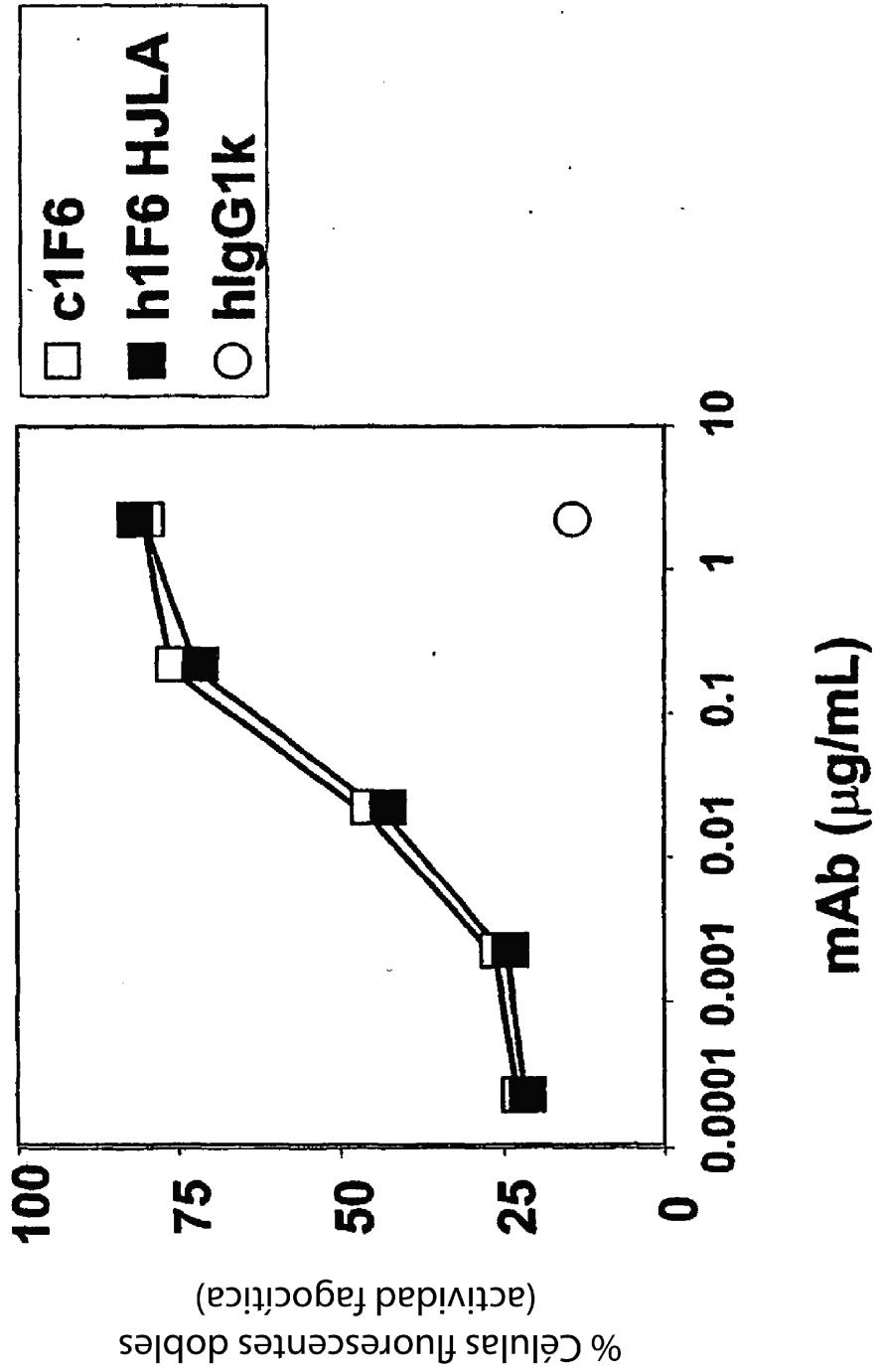


Fig 7

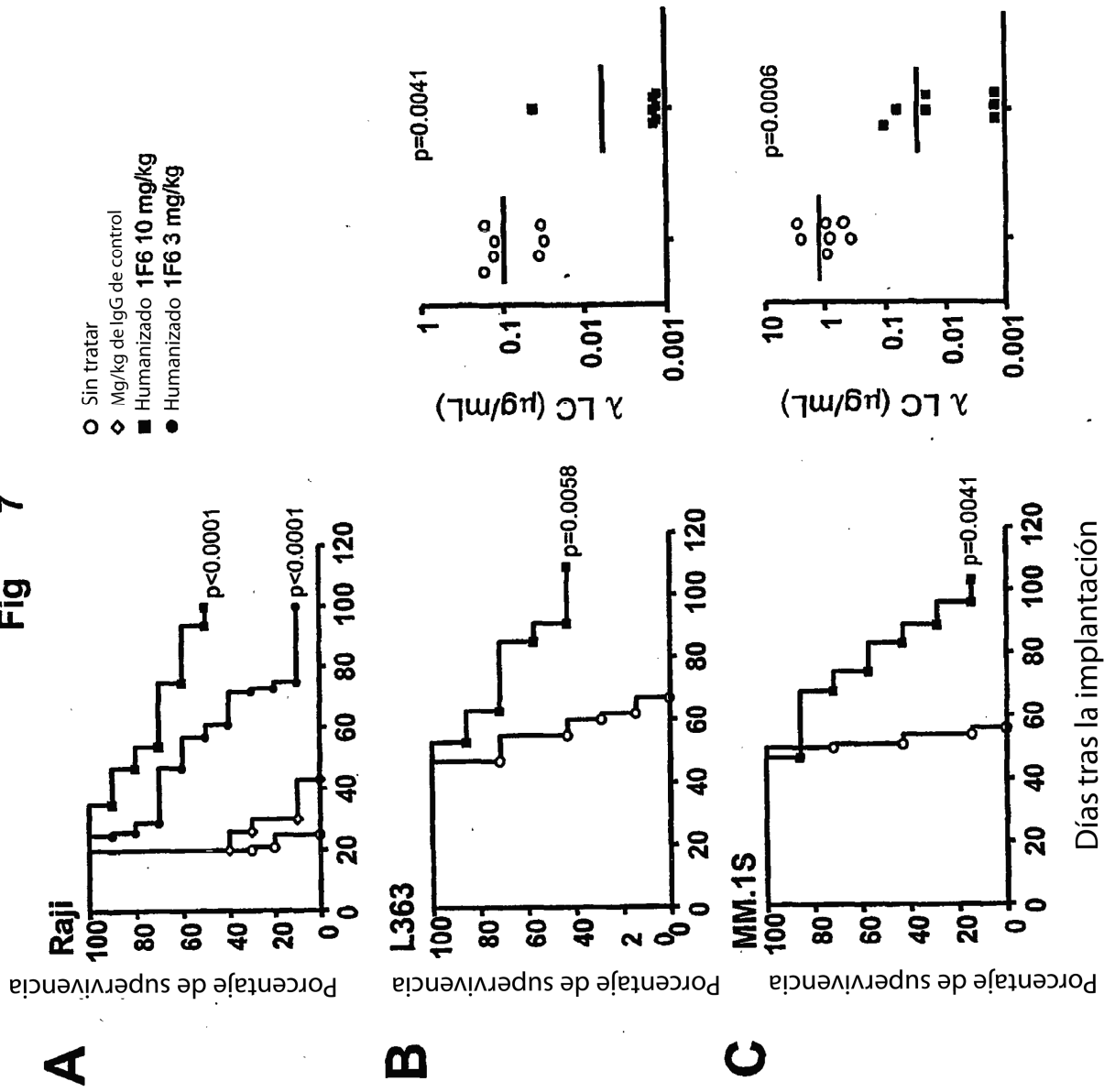


Fig 8

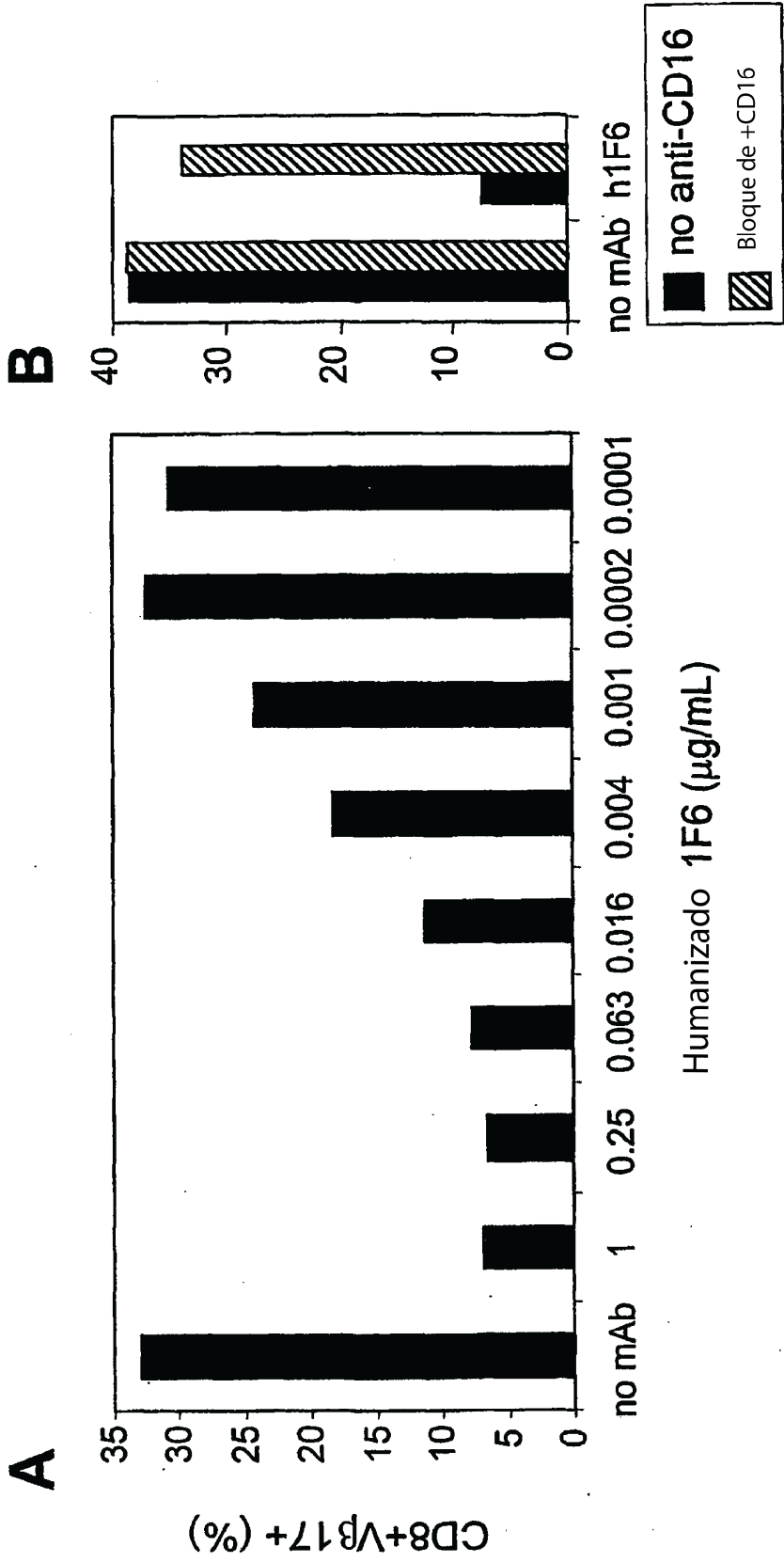


Fig 9

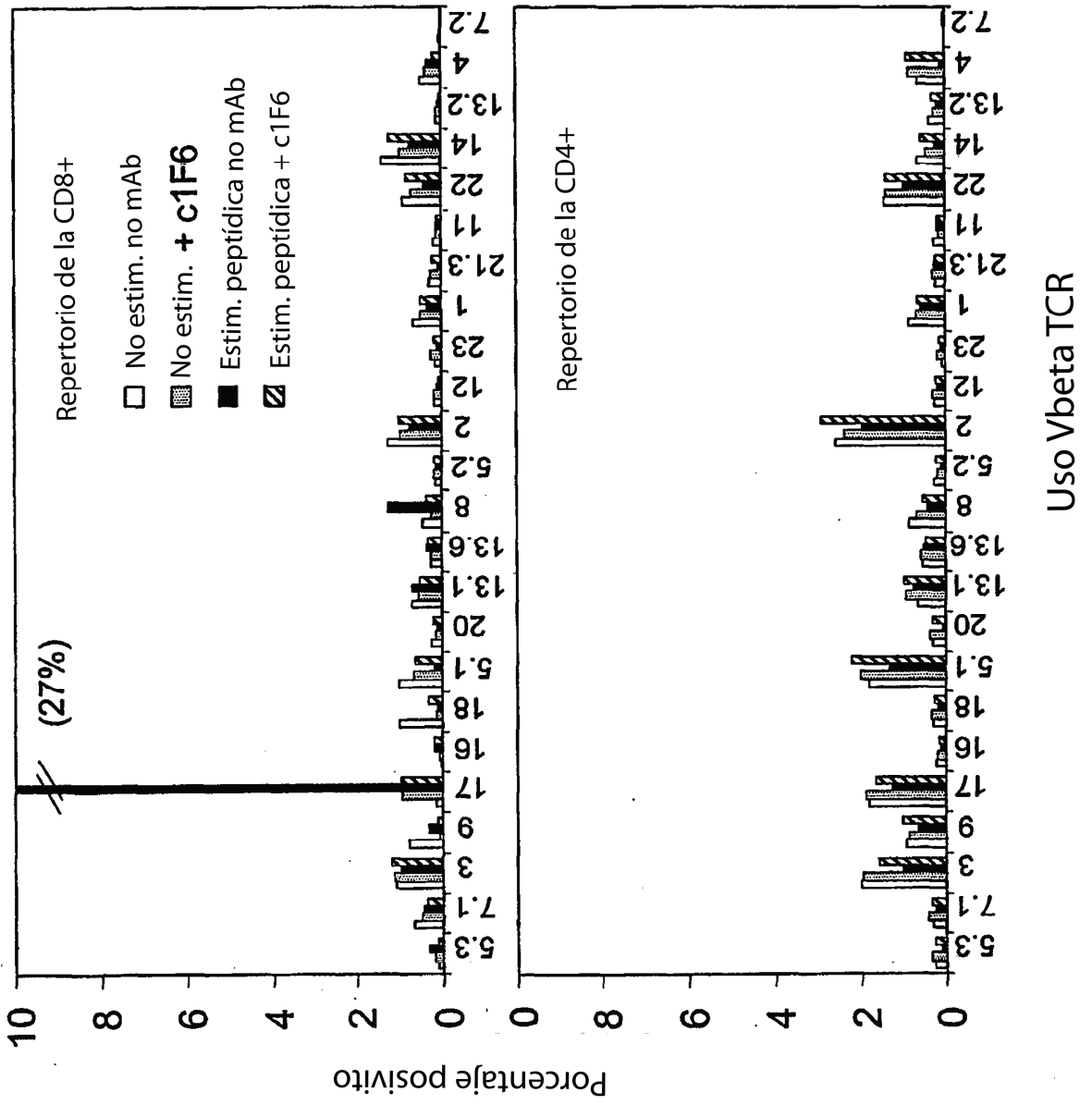
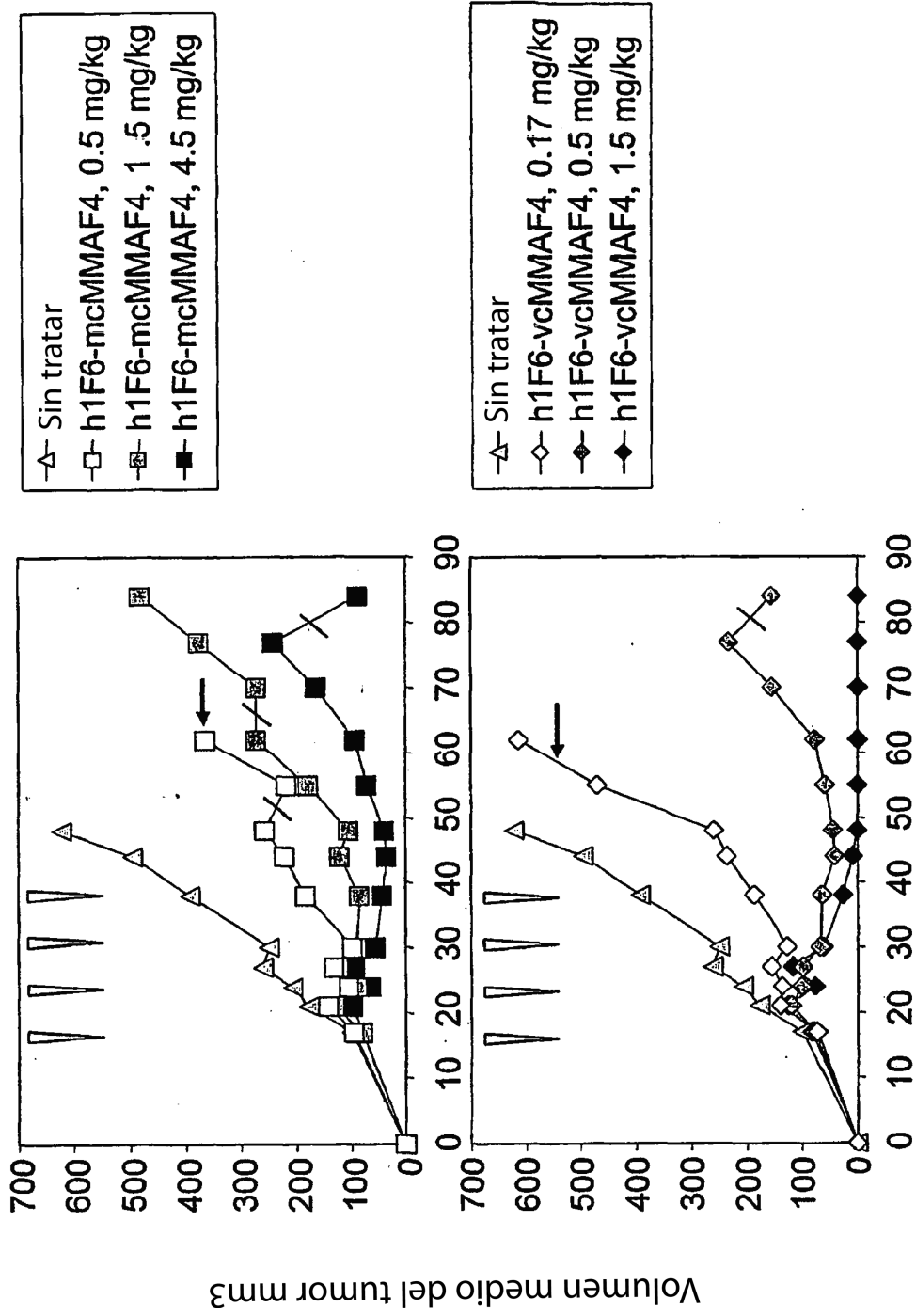


Fig 10A



Días tras el implante tumoral

Fig 10B

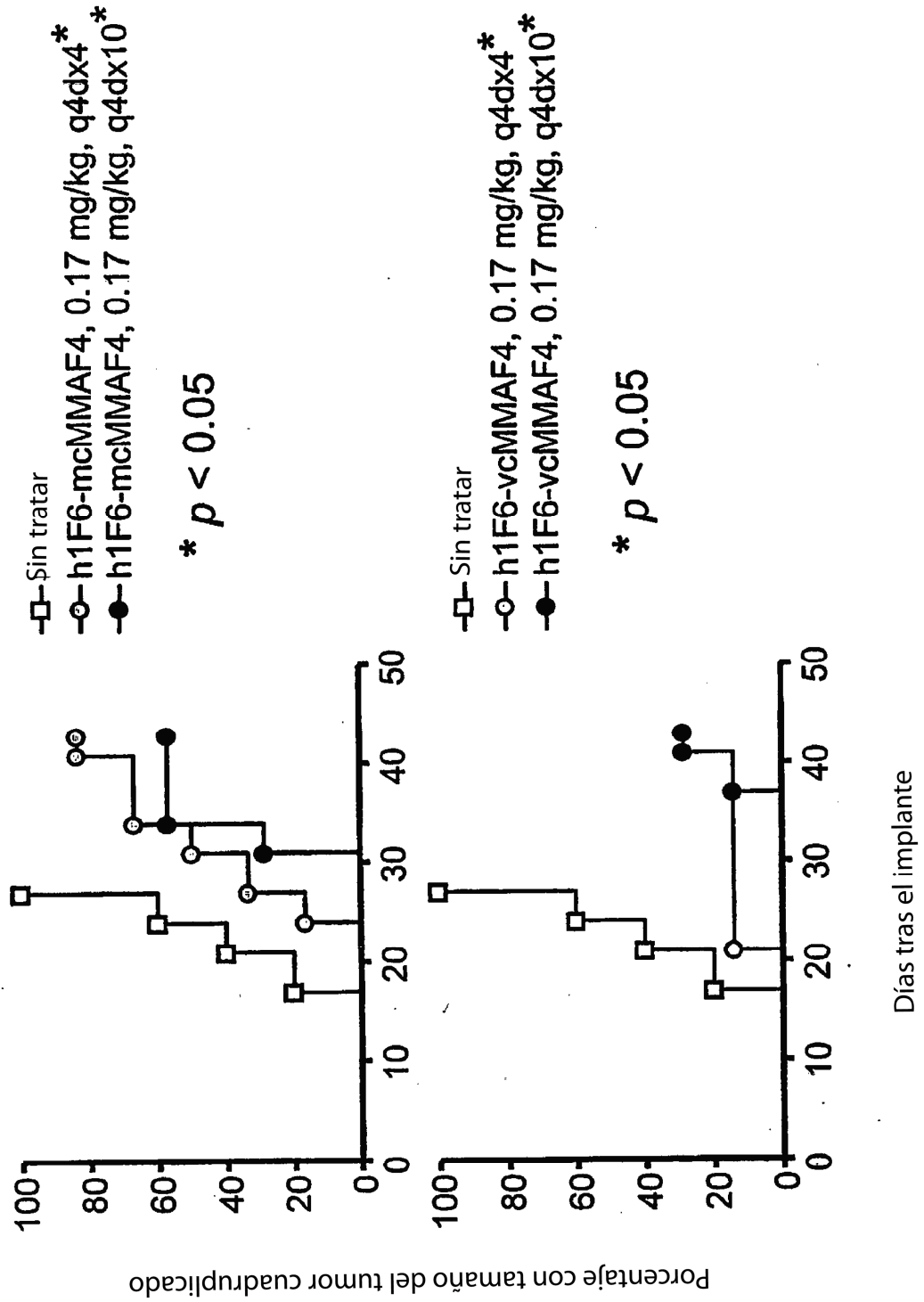


Fig 11A

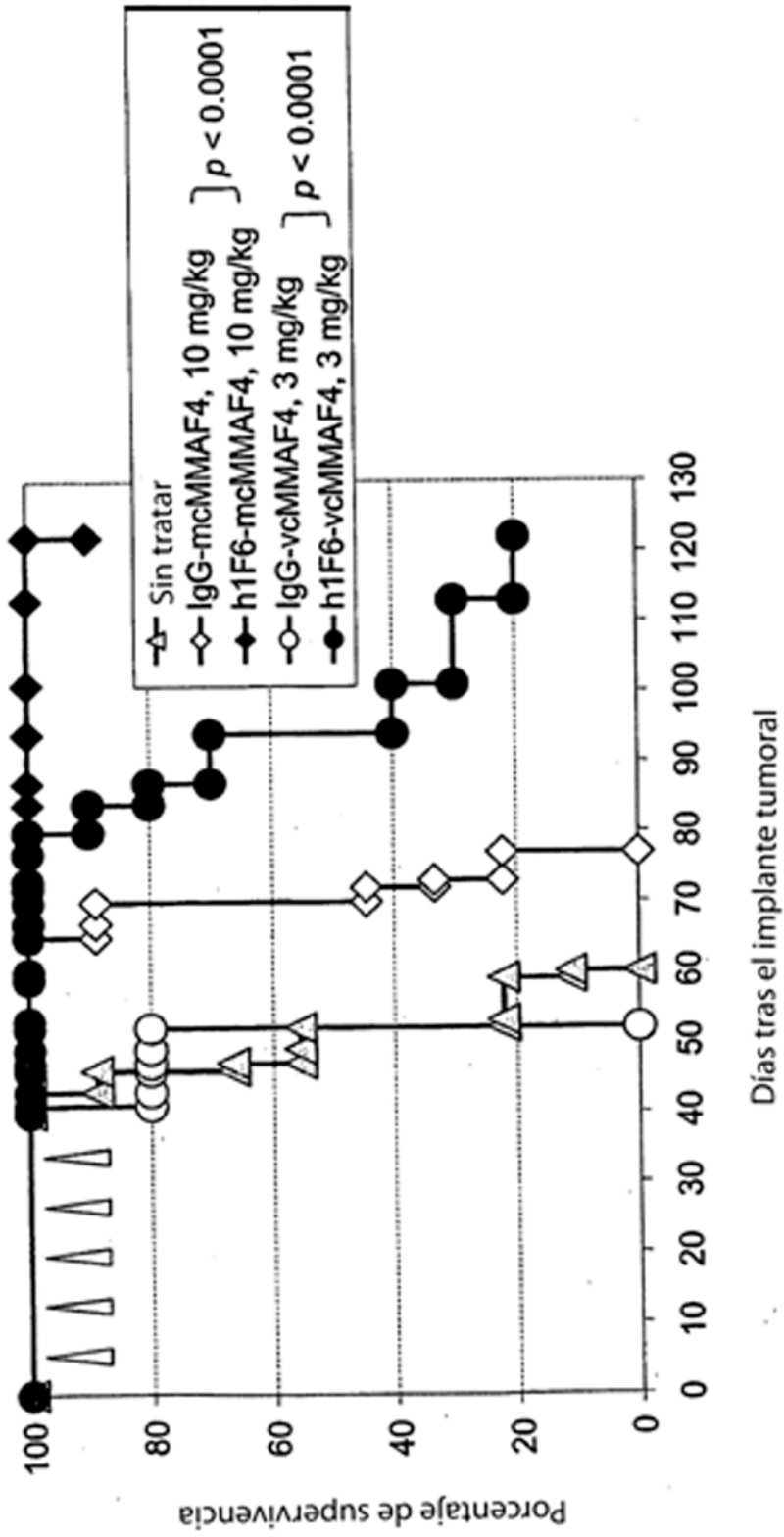


Fig 11B

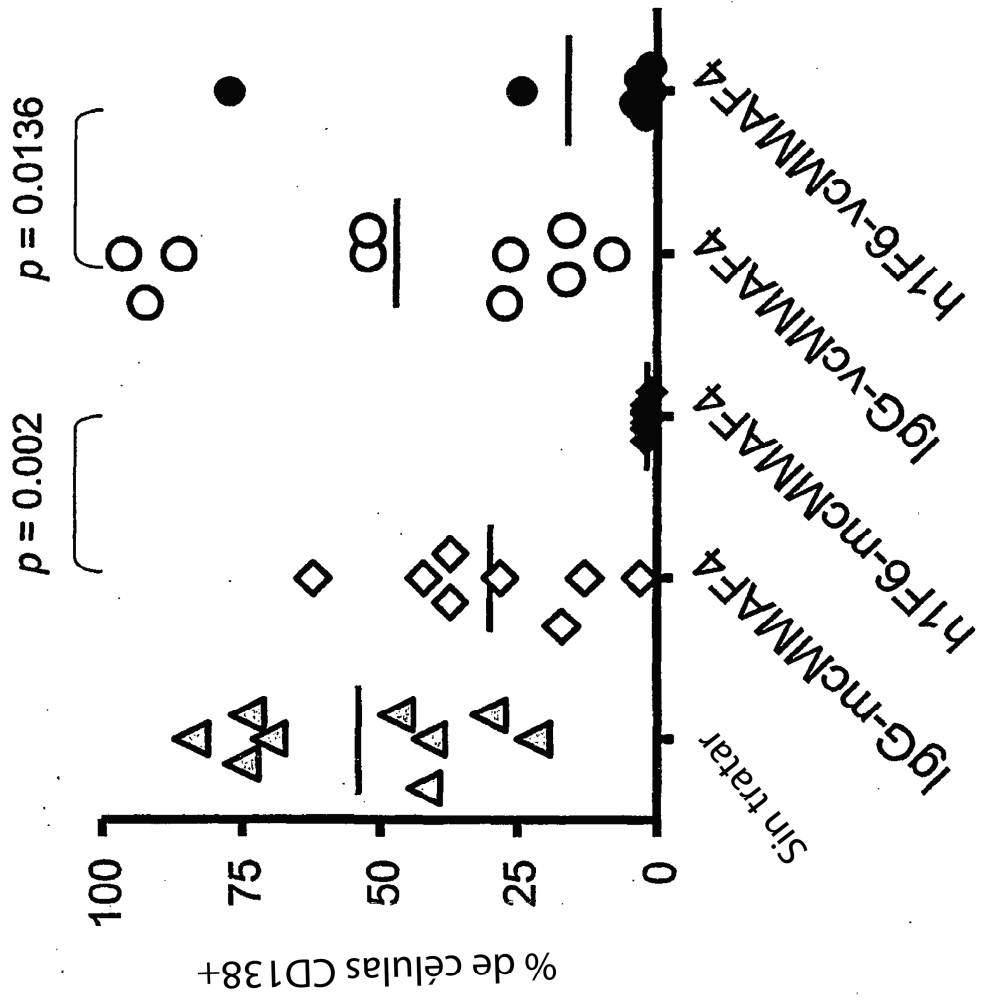


Fig 12A

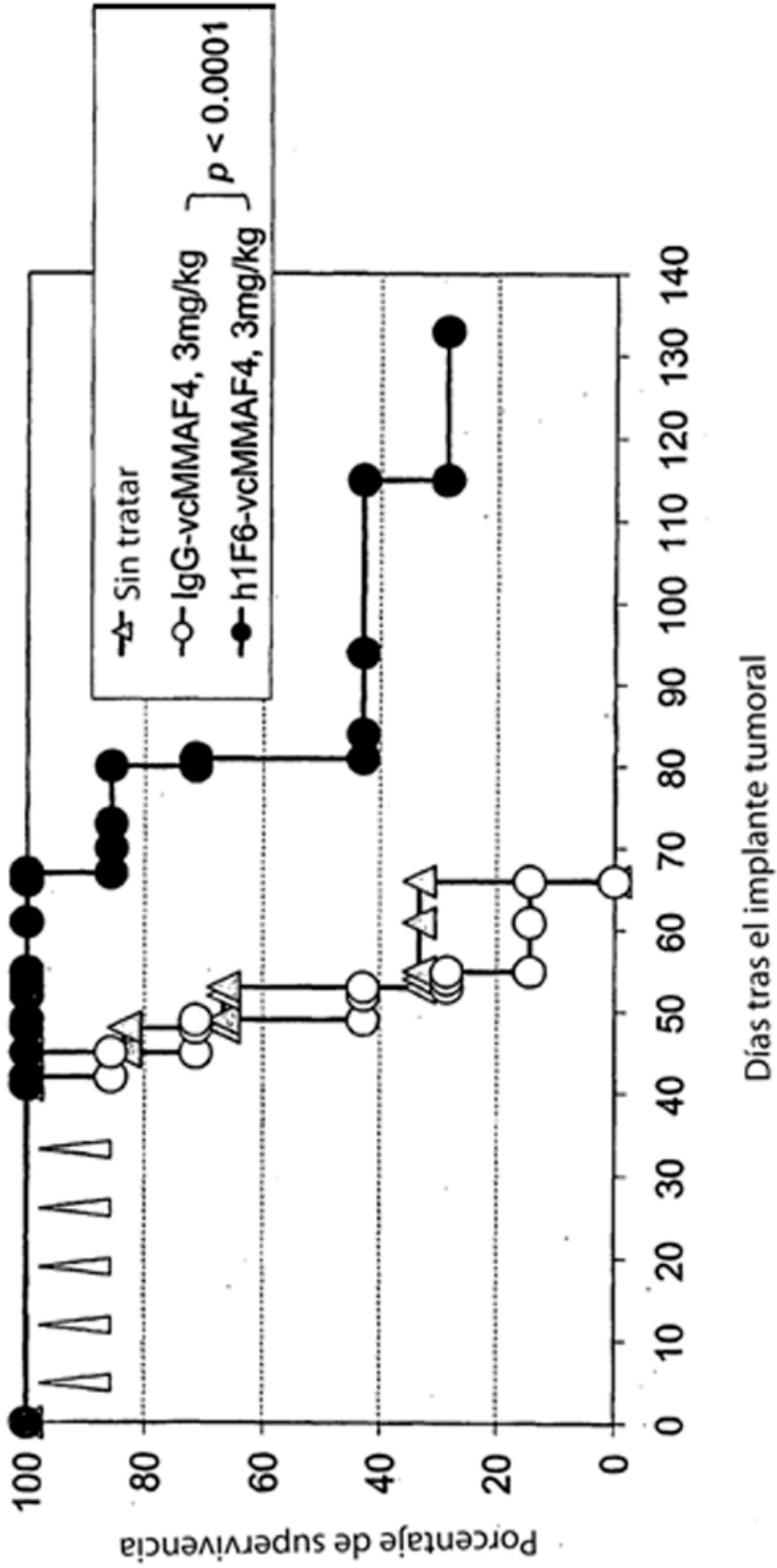


Fig 12B

