

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 794**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2006 E 06720888 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 1848745**

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

30 Prioridad:

**18.02.2005 US 654197 P**

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

**25.09.2014**

73 Titular/es:

**MEDAREX, L.L.C. (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**CARDARELLI, JOSEPHINE M. y  
BLACK, AMELIA NANCY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 498 794 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra CD30 que carecen de restos fucosilo

**Antecedentes de la invención**

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

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

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

20 Posteriormente, CD30 mostró ser expresado en un subconjunto de linfomas no Hodgkin (LNH), incluyendo el linfoma de Burkitt, linfomas de células grandes anaplásicas (LCGA), linfomas cutáneos de linfocitos T, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de linfocitos T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de linfocitos T (LLLT), leucemia de linfocitos T en adulto (LLT-A) y linfomas foliculares eritroblásticos/centrocíticos (eb/cc) (Stein y col., *Blood* 66:848 (1985); Miettinen, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:1197 (1992); Piris y col., *Histopathology* 17:211 (1990); Burns y col., *Am. J. Clin. Pathol.* 93:327(1990); y Eckert y col., *Am. J. Dermatopathol.* 11:345 (1989)), así como diversas líneas viralmente transformadas tales como linfocitos T transformados con virus linfotrófico de linfocitos T humanos I o II y linfocitos B transformados con el virus de Epstein-Barr (Stein y col., *Blood* 66:848 (1985); Andreesen y col., *Blood* 63:1299 (1984)). Además, la expresión de CD30 se ha documentado en carcinomas embrionarios, carcinomas no embrionarios, melanomas neoplásicos, tumores mesenquimáticos, y líneas celulares mieloides y macrófagos en fases de diferenciación tardías (Schwartz y col., *Blood* 74:1678 (1989); Pallesen y col., *Am. J. Pathol.* 133:446 (1988); Mechtersheimer y col., *Cancer* 66:1732 (1990); Andreesen y col., *Am. J. Pathol.* 134:187 (1989)).

25 Dado que el porcentaje de células CD30 positivas en individuos normales es bastante pequeño, la expresión de CD30 en células tumorales la convierte en una diana importante para la terapia mediada por anticuerpos para dirigir específicamente agentes terapéuticos contra células neoplásicas CD30 positivas (Chaiarle, R., y col. *Clin. Immunol.* 90(2):157-164 (1999)). La terapia mediada por anticuerpos ha mostrado que aumenta la citotoxicidad de células CD30 positivas tanto por la activación del complemento como por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (Pohl C., y col. *Int J Cancer* 54:418 (1993)). Sin embargo, aunque los resultados obtenidos hasta ahora establecen claramente a CD30 como una diana útil para inmunoterapia, también muestran que anticuerpos murinos disponibles actualmente no constituyen agentes terapéuticos ideales. La terapia pasiva con anticuerpos no ha sido eficaz *in vitro* o *in vivo* contra pacientes con enfermedad de Hodgkin refractaria. Un ensayo clínico del anticuerpo anti-CD30 Ber-H2 mostró la localización del anticuerpo, pero sin respuestas (Falini B. y col. (1992) *Brit J Haematol.* 82:38-45; Koon, H.B. y col. (2000) *Curr Opin in Oncol.* 12:588-593). A través del acoplamiento de un anticuerpo anti-CD30 a una toxina de ricina desglucosilada-toxina de cadena A, se mostró citotoxicidad en el tratamiento de enfermedad de Hodgkin humana en un modelo de ratón SCID, aunque también se observaron toxicidades de grado 3 en los sujetos (Schell, R. y col. (2002) *Annals of Oncology* 13:57-66).

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

**Sumario de la Invención**

5 La presente invención proporciona anticuerpos defucosilados aislados (es decir, anticuerpos que carecen de restos de fucosa) que se unen a la CD30 humana y que presentan destrucción de citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos (CCDA) potenciada de células que expresan CD30 en comparación con la forma no defucosilada del anticuerpo (es decir, anticuerpos que contienen restos de fucosa). También se proporcionan procedimientos para el tratamiento de diversas enfermedades en las que interviene la expresión de CD30 usando los anticuerpos y las composiciones de la invención.

10 El anticuerpo monoclonal defucosilado aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, puede unirse a CD30 humana con una  $K_D$  de  $10 \times 10^{-8}$  M o menor, más preferentemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menor, más preferentemente  $5 \times 10^{-9}$  o menor o incluso más preferentemente,  $1 \times 10^{-9}$  o menor.

15 Los anticuerpos defucosilados pueden unirse a CD30 e inhibir el crecimiento de células que expresan CD30 potenciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) en presencia de células efectoras humanas (por ejemplo, monocitos o células mononucleares), en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo. El anticuerpo defucosilado puede mediar la CCDA aumentada de células que expresan CD30 en presencia de células efectoras humanas pero en presencia de células efectoras de ratón.

20 Un anticuerpo defucosilado puede inducir la CCDA de células L1236 *in vitro* en la que la forma fucosilada del anticuerpo no induce CCDA, en condiciones de una concentración de anticuerpo de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  y a una proporción de células diana con respecto a células efectoras de 1:50. Un anticuerpo defucosilado puede potenciar la CCDA de células L540, L428 y Karpas *in vitro* en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo, en condiciones de una concentración de anticuerpo de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  y a una proporción de células diana con respecto a células efectoras de 1:50. Por consiguiente, los anticuerpos proporcionaron un medio mejorado para el tratamiento de trastornos caracterizados por la expresión de CD30.

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

30 La invención proporciona un anticuerpo anti-CD30 monoclonal, defucosilado, aislado, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 7, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 10, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 13, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 16, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 19 y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 22.

35 El anticuerpo puede comprender:

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

40 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-CD30, en el que dicha célula hospedadora carece de una fucosiltransferasa de tal manera que el anticuerpo anti-CD30 expresado por dicha célula hospedadora carece de restos de fucosa. Preferentemente, los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Preferentemente, la fucosiltransferasa es FUT8. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula CHO.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* de inhibición del crecimiento de células CD30<sup>+</sup>. El procedimiento implica poner en contacto las células con un anticuerpo anti-CD30 defucosilado en condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de dichas células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

50 La invención también proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento de inhibición de crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en un sujeto. El procedimiento implicar administrar a un sujeto un anticuerpo anti-CD30 defucosilado en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en el sujeto. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano. En realizaciones preferidas, las células tumorales son células tumorales de la enfermedad de Hodgkin (EH) o células tumorales de linfoma de células grandes anaplásicas (LPGA).

**Breve Descripción de las Figuras**

- 5 La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 30) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 1) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F11. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 7), CDR2 (SEC ID N°: 10) y CDR3 (SEC ID N°: 13) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 10 La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 33) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F11. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 16), CDR2 (SEC ID N°: 19) y CDR3 (SEC ID N°: 22) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.
- 15 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 31) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 17G1. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 8), CDR2 (SEC ID N°: 11) y CDR3 (SEC ID N°: 14) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.
- La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 34) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 5) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 17G1. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 17), CDR2 (SEC ID N°: 20) y CDR3 (SEC ID N°: 23) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.
- 20 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 32) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 3) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2H9. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 9), CDR2 (SEC ID N°: 12) y CDR3 (SEC ID N°: 15) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 25 La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 35) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 6) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2H9. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 18), CDR2 (SEC ID N°: 21) y CDR3 (SEC ID N°: 24) están delimitadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.
- 30 La Figura 4 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de destrucción celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de Hodgkin humano L540, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).
- La Figura 5 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de destrucción celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de Hodgkin humano L428, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).
- 35 La Figura 6 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de destrucción celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de Hodgkin humano L1236, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).
- La Figura 7 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de destrucción celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 sobre la línea celular de linfoma de linfocitos T humanos Karpas, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente (1D4).
- 40 Las Figuras 8A-8B muestran las secuencias de aminoácidos de las líneas germinales humanas V<sub>H</sub> 3-11, V<sub>K</sub> L15, V<sub>K</sub> A27 y V<sub>K</sub> L6 (SEC ID N°: 25-29, respectivamente), se dibujan las CDR.
- La Figura 9 es un gráfico que muestra el bloqueo de la actividad CCDA con un anticuerpo anti-CD16.
- La Figura 10 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de destrucción celular de las formas fucosilada y defucosilada de 5F11 en presencia de células efectoras de ratón (panel de la izquierda) o humanas (panel de la derecha).
- 45 La Figura 11 es un gráfico que muestra un ensayo de CCDA usando sangre de cinomolgo.

**Descripción Detallada de la Invención**

- 50 La presente invención proporciona composiciones de anticuerpo y células CD30 y/o que expresan CD30 asociadas mejoradas. Los anticuerpos de la invención carecen de restos fucosilados en las cadenas carbohidrato del anticuerpo. Además, los anticuerpos presentan destrucción citotóxica celular dirigida por anticuerpos (CCDA) potenciada de células CD30+. En una realización particular, el anticuerpo de la presente invención puede destruir células CD30+ en condiciones en las que la forma fucosilada del anticuerpo no destruiría eficazmente células CD30+. En otra realización, el anticuerpo de la presente invención potencia la destrucción de células CD30+ en comparación con la

forma fucosilada del anticuerpo. En una realización, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos completamente humanos y son particularmente útiles para el tratamiento terapéutico en seres humanos de trastornos asociados con células que expresan CD30. En la invención también se incluyen anticuerpos anti-CD30 que carecen de restos fucosilo para su uso en los procedimientos de tratamiento terapéutico (por ejemplo, para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con la expresión de CD30).

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

Los términos "CD30" y "antígeno CD30" se usan indistintamente en este documento e incluyen cualquier variante, isoforma y homólogo de especie de CD30 humana que las células expresan de manera natural. La secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD30 humana tiene el número de acceso a Genbank NP\_001234. La secuencia completa de ADNc que codifica la proteína CD30 humana tiene el número de acceso a Genbank NM\_001243.

Como se usa en este documento, las expresiones "anticuerpo que carece de restos de fucosa" y "anticuerpo defucosilado" se usan indistintamente y pretende referirse a un anticuerpo en el que la parte carbohidrato del anticuerpo no contiene un resto fucosilo o del cual se ha eliminado el resto fucosilo. Un anticuerpo que carece de restos de fucosa puede generarse, por ejemplo, por expresión del anticuerpo en una célula o sistema de expresión que minimiza o no une restos fucosilo a la cadena carbohidrato del anticuerpo, o por modificación química del anticuerpo para eliminar los restos fucosilo de la cadena carbohidrato (por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con una fucosidasa). Como tal, las expresiones "carecer de restos de fucosa" y "defucosilado" no pretenden limitarse por el mecanismo mediante el cual se prepara el anticuerpo con estructura carbohidrato alterada.

Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo que expresa restos de fucosa" y "anticuerpo fucosilado" se usan indistintamente y pretenden referirse a un anticuerpo en el que la parte carbohidrato del anticuerpo contiene fucosa.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o en el hígado (incluyendo, anticuerpos citocinas y complemento) que da como resultado lesión selectiva para destrucción de eliminación del organismo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

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

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

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

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

El término "anticuerpo" como se refiere en este documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" se

refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos hospedadores o factores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD30). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que comprende los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (iv) un fragmento Fv que comprende los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consta de un dominio  $V_H$ ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios de fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes diferentes, estos pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un engarce sintético que permite que se formen como una sola cadena proteica en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv monocatenario (scFv, *single chain Fv*); véase por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se exploran para su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

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

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

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las regiones CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se obtiene de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una sola especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un

transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada. La expresión "anticuerpo monoclonal humano", como se usa en este documento, también incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes humanos de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria y (d) anticuerpos preparados expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco conservadas y las CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a una mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes o secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal humana, pueden no existir de manera natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

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

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

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

El término "epítope" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a, o unirse específicamente por, un anticuerpo. Normalmente los epítopes constan de agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopes conformacionales y no conformacionales se diferencian en que la unión a los últimos pero no a los últimos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Como se usa en este documento, "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo con un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K<sub>D</sub>) de 10<sup>-7</sup> M o menor, y se une al antígeno predeterminado con una K<sub>D</sub> que es al menos dos veces menor que su K<sub>D</sub> para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en este documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

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

El término "vector," como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores tienen capacidad de realizar replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se mencionan en este documento como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector"

pueden utilizarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más habitualmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

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

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

15 La expresión "animal transgénico no humano" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o uno más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgen de cadena ligera humana y un transgen de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos anti-CD30 humanos cuando se inmuniza con antígeno CD30 y/o células que expresan CD30. El transgen de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso, por ejemplo, de ratones HuMAb transgénicos, o el transgen de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos puede producir isotipos múltiples de anticuerpos monoclonales humanos contra CD30 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo

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

#### Anticuerpos anti-CD30 que carecen de restos de fucosa y que tienen actividad CCDA potenciada

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

35 La actividad CCDA aumentada de un anticuerpo defucosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como un aumento en el porcentaje de lisis celular, en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo, cuando la CCDA se mide en las mismas condiciones para las formas defucosilada y fucosilada (por ejemplo, mismas concentraciones de anticuerpo y mismas proporciones de célula diana con respecto a célula efectora). Preferentemente, un anticuerpo anti-CD30 defucosilado de la invención aumenta el porcentaje de lisis de células CD30+ en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo al menos 1,25 veces (es decir, la proporción del % de lisis de la forma defucosilada con respecto a la forma fucosilada es al menos 1,25), más preferentemente al menos 2 veces, incluso más preferentemente al menos 2,5 veces e incluso más preferentemente al menos 3 veces. En diversas realizaciones, la forma defucosilada del anticuerpo aumenta el porcentaje de lisis de células CD30+ en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo de 1,25 a 3,25 veces, preferentemente de 1,5 a 3,25 veces, incluso más preferentemente de 1,61 a 3,25 veces, incluso más preferentemente de 2,15 a 3,25 veces, e incluso más preferentemente de 2,63 a 3,25 veces, preferentemente en condiciones en las que el anticuerpo está a una concentración de 25 µg/ml y la proporción de célula diana con respecto a célula efectora es de 1:50.

40 De manera adicional o como alternativa, la actividad CCDA aumentada de un anticuerpo defucosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como una fuerza aumentada medida por una disminución en el valor de CE<sub>50</sub> para la forma defucosilada, en comparación con la forma fucosilada. Esto puede cuantificarse por la proporción de la CE<sub>50</sub> para la forma fucosilada con respecto a la forma defucosilada. Preferentemente, la proporción de CE<sub>50</sub> de la forma fucosilada con respecto a la forma defucosilada para CCDA de células CD30+ es al menos 3 (es decir, la CE<sub>50</sub> de la forma defucosilada es 3 veces menor que la CE<sub>50</sub> de la forma fucosilada), más preferentemente, al menos 4, incluso más preferentemente al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 15 o al menos 20. En diversas realizaciones, la proporción de CE<sub>50</sub> de la forma fucosilada con respecto a la forma defucosilada para CCDA de células CD30+ es de 2 a 27,1, más preferentemente de 4 a 27,1, incluso más preferentemente de 4,7 a 27,1, incluso más preferentemente de 7,8 a 27,1, e incluso más preferentemente de 11,1 a

27,1. Preferentemente, los valores de CE<sub>50</sub> se determinan en ensayos de CCDA que usan una proporción de célula diana con respecto a célula efectora de 1:50 y concentraciones de anticuerpo de 0,0001 µg/ml a 10 µg/ml o mayor.

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

#### Desfucosilación de anticuerpos anti-CD30

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

25 En una realización, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de tal manera que la línea celular produce proteínas carentes de fucosa en sus carbohidratos. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares FUT8<sup>-/-</sup> Ms704, Ms705 y Ms709 se crearon por alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores reemplazo (véase la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040110704 de Yamane y col. y Yamane-Ohnuki y col. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai y col. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación por reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace 1,6 alfa. Hanai y col. también describen líneas celulares que tienen de forma natural una baja actividad enzimática para la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos Asn (297) ligados, produciendo también la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. y col. (2002) J Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana y col. describe líneas celulares diseñadas para expresar glucosiltransferasas de modificación de glucoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas muestran estructuras GlcNac de disección aumentadas que dan como resultado actividad CCDA aumentada de los anticuerpos (véase también Umana y col. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

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

45 De manera adicional, en otras realizaciones, también se modifican otras formas de glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede crearse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). Dichas modificaciones de carbohidrato pueden conseguirse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, puede realizarse una o más sustituciones de aminoácido que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región marco conservada de la región variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicha estrategia se describe en detalle adicional en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.714.350 y 6.350.861 de Co y col.

#### Caracterización de la ausencia de restos fucosilo en anticuerpos anti-CD30

55 Los anticuerpos de la invención carecen de restos fucosilo, por ejemplo en la cadena carbohidrato de la parte Fc. La ausencia de restos fucosilo de los anticuerpos puede ensayarse usando técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como electroforesis capilar en APTS con fluorescencia inducida por láser. En resumen, los oligosacáridos unidos a N del anticuerpo anti-CD30 purificado pueden liberarse añadiendo el péptido N-glucanasa (Prozyme) e incubando durante una noche. Los carbohidratos se resuspenden y se derivatizan con 8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato (APTS) en condiciones suaves de aminación reductora en las que se minimiza la desialilación y la

pérdida de restos fucosilo. Los aductos de reacción se analizan por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducida por láser (Beckman Coulter). Una ausencia de fucosa puede observarse por un cambio en la electroforesis en comparación con el mismo anticuerpo que contiene fucosa. Otra técnica para ensayar la ausencia de fucosa en anticuerpos anti-CD30 es un análisis de monosacáridos usando HPLC. Adicionalmente en los ejemplos se describen ensayos adecuados para determinar la unión de CD30.

#### Caracterización de destrucción celular dependiente de anticuerpos de células CD30+

La capacidad de los anticuerpos anti-CD30 defucosilados para mediar la fagocitosis y destruir células que expresan CD30 puede ensayarse. En una realización, un anticuerpo anti-CD30 defucosilado potencia la destrucción de células que expresan CD30 en comparación con el mismo anticuerpo que contiene fucosa cuando se compara a la misma concentración. En otra realización, un anticuerpo anti-CD30 defucosilado induce la destrucción de células que expresan CD30 mientras que el mismo anticuerpo que contiene fucosa no induce destrucción celular a la misma concentración.

La actividad CCDA de un anticuerpo monoclonal puede ensayarse en ensayos *in vitro* establecidos. Como ejemplo, puede usarse un ensayo de CCDA de liberación de cromo. En resumen, pueden purificarse células mononucleares de sangre periférica (CMSP), u otras células efectoras, de donantes sanos por centrifugación en densidad de Ficoll Hypaque, seguido de lisis de los eritrocitos contaminantes. Las CMSP lavadas pueden suspenderse en RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10 % inactivado por calor y mezclarse con células que expresan CD30 marcadas con <sup>51</sup>Cr, a diversas proporciones de células efectoras con respecto a células tumorales (células efectoras: células tumorales). Después, el anticuerpo anti-CD30 puede añadirse a diversas concentraciones. Como control negativo puede usarse un anticuerpo de isotipo coincidente. Los ensayos pueden realizarse durante 4-18 horas a 37 °C. Las citólisis de las muestras puede ensayarse midiendo la liberación de <sup>51</sup>Cr en el sobrenadante de cultivo. El anticuerpo monoclonal anti-CD30 también puede ensayarse en combinaciones con otros para determinar si la citólisis se potencia con anticuerpos monoclonales múltiples.

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

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

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

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

#### Caracterización de la unión a CD30

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse con respecto a la unión a CD30, por ejemplo, por ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis FACS y/o análisis Biacore. En resumen, en un ensayo ELISA típico se revisten placas de microtitulación con CD30 purificada a 0,25 µg/ml en PBS y después se bloquean con albúmina de suero bovino al 5 % en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos o reactivo policlonal de cabra específico anti-Fc de IgG humana)

conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml) y se analizan a una DO de 405-650.

- 5 Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CD30, puede usarse citometría de flujo. En un ejemplo típico (pero no limitante) de un protocolo de citometría de flujo, líneas celulares que expresan CD30 (cultivadas en condiciones de crecimiento convencionales) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contienen ASB al 0,1 % y suero de ratón al 20 % y se incuban a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humana) en las mismas condiciones que la tinción con anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse con un instrumento FACScan usando propiedades de dispersión de luz y lateral para obtener acceso a células individuales. Puede usarse un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este procedimiento permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.
- 10
- 15 Adicionalmente, la reactividad de los anticuerpos anti-CD30 con el antígeno CD30 puede ensayarse con transferencia de Western. Por ejemplo, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan CD30 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ratón al 20 % y se exploran con los anticuerpos monoclonales a ensayar. La unión del anticuerpo puede detectarse usando anticuerpo secundario específicos anti-especie unido a fosfatasa alcalina y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). En la técnica se conocen otras técnicas para evaluar la capacidad de unión de anticuerpos a CD30, incluyendo análisis RIA y Biacore. En los ejemplos se describen en detalle ejemplos adecuados para determinar la unión a CD30.
- 20

#### Anticuerpos anti-CD30 quiméricos o humanizados

- 25 Un anticuerpo anti-CD30 defucosilado puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. Dichos anticuerpos pueden prepararse usando anticuerpos anti-CD30 de ratón que se encuentran disponibles en la técnica y procedimientos establecidos para convertir un anticuerpo de ratón en un anticuerpo quimérico o humanizado. Ejemplos no limitantes de dichos anticuerpos anti-CD30 de ratón incluyen los anticuerpos monoclonales AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 y Ber-H8. Además, en la publicación PCT WO 02/4661 se describen anticuerpos anti-CD30 humanizados.
- 30

#### Anticuerpos anti-CD30 monoclonales humanos

- Los anticuerpos preferidos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales anti-CD30 humanos. Ejemplos de anticuerpos anti-CD30 monoclonales humanos incluyen los anticuerpos 5F11, 17G1 y 2H9, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe originalmente en la Publicación PCT WO 03/059282. Las secuencias de aminoácidos  $V_H$  de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 1, 2 y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos  $V_L$  de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 4, 5 y 6, respectivamente.
- 35

- Dado que cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a CD30, las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  pueden "mezclarse y emparejarse" para crear otras moléculas de unión anti-CD30. La unión de CD30 de dichos anticuerpos "mezclados y emparejados" puede ensayarse usando los ensayos de unión bien conocidos en la materia, tales como análisis FACS y ensayos ELISA. Preferentemente, cuando las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  se mezclan y se emparejan, una secuencia  $V_H$  de un emparejamiento  $V_H/V_L$  particular se reemplaza con una secuencia  $V_H$  estructuralmente similar. Del mismo modo, preferentemente una secuencia  $V_L$  de un emparejamiento  $V_H/V_L$  particular se reemplaza con una secuencia  $V_L$  estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias  $V_H$  de 5F11 y 2H9 son particularmente factibles de mezclar y emparejar, dado que estos anticuerpos usan secuencias  $V_H$  derivada de la misma secuencia de línea germinal ( $V_H$  4-34) y por tanto presentan similitud estructural.
- 40
- 45

En el presente documento se describe un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 1, 2 y 3; y
- 50 (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 4, 5 y 6;

en el que el anticuerpo se une específicamente a la CD30 humana.

Una combinación de cadena pesada y ligera preferida es:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; u
- 55

Otras combinaciones incluyen:

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

10 En el presente documento se describen anticuerpos defucosilados que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 5F11, 17G1 y 2H9 o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 V<sub>H</sub> de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 7, 8 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 V<sub>H</sub> de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 10, 11 y 12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 V<sub>H</sub> de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 13, 14 y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 V<sub>K</sub> de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 16, 17 y 18, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 V<sub>K</sub> de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 19, 20 y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 V<sub>K</sub> de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC ID Nos: 22, 23 y 24, respectivamente. Las regiones CDR se delimitan usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH n° 91-3242).

20 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CD30 y que la especificidad de unión a antígeno la proporciona principalmente las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias CDR1, 2 y 3 V<sub>H</sub> y la secuencias CDR1, 2 y 3 V<sub>K</sub> pueden "mezclarse y emparejarse" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden estar mezcladas y emparejadas, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 V<sub>H</sub> y una CDR1, 2 y 3 V<sub>K</sub> para crear otras moléculas de unión anti-CD30 de la invención. La unión de CD30 de dichos anticuerpos "mezclados y emparejados" puede ensayarse usando ensayos de unión conocidos en la materia, por ejemplo, análisis FACS y ensayos ELISA. Preferentemente, cuando las secuencias CDR V<sub>H</sub> se mezclan y se emparejan la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V<sub>H</sub> particular se reemplaza con una secuencia (o secuencias) CDR estructuralmente similar. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR V<sub>K</sub> se mezclan y se emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V<sub>K</sub> particular preferentemente se reemplaza con una secuencia (o secuencias) CDR estructuralmente similar. Será fácilmente obvio para el experto habitual en la técnica que puedan crearse nuevas secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> sustituyendo una o más secuencias de la región CDR V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR descritas en este documento para anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1 y 2H9.

30 Por consiguiente, en el presente documento se describe un anticuerpo monoclonal defucosilado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 35 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 7, 8 y 9;  
 (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 10, 11 y 12;  
 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 13, 14 y 15;  
 (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 16, 17 y 18;  
 40 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 19, 20 y 21; y  
 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 22, 23 y 24;

en el que el anticuerpo se une específicamente a CD30.

45 En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

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

Otro anticuerpo descrito comprende:

- 55 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 8;  
 (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 11;  
 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 14;  
 (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 17;  
 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 20; y  
 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 24.

Otro anticuerpo descrito comprende:

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

#### Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

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

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

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

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

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

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) por unión operativa del ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Ser humano Services, publicación NIH n° 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda pero más preferentemente es una región constante kappa.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de tal manera que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el engarce flexible (véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426; Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty y col., (1990) *Nature* 348:552-554).

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

#### Producción de anticuerpos monoclonales de la invención

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

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

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

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hidridoma murino de interés y diseñarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 de Cabilly y col.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una región marco conservada humana usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.225.539 de Winter y las Patentes de Estados Unidos Nos 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.). En la técnica se conocen diversos anticuerpos de ratón anti-CD30 que pueden usarse para crear anticuerpos anti-CD30 quiméricos o humanizados, por ejemplo, AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 y Ber-H8.

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD30 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones mencionados en el presente documento como ratones HuMAB y ratones KM, respectivamente y se mencionan en su conjunto en este documento como "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAB® (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus endógenos de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  (véase, por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran expresión reducida de IgM de ratón o  $\kappa$ , y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgG $\kappa$  monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. y col. (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 y Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMab y las modificaciones genómicas que llevan dichos ratones se describen adicionalmente en Taylor, L. y col. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. y col. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi y col. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. y col. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille y col. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. y col. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. y col. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, cuyos contenidos se incorporan en este documento específicamente por referencia en su totalidad. Véanse también, las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la Patente de Estados Unidos N° 5.545.807 de Surani y col.; las publicaciones PCT N° WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO

97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT nº WO 01/14424 de Korman y col.

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

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

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

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando procedimientos de presentación en fagos para explorar genotecas de inmunoglobulina humana. Dichos procedimientos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las Patentes de Estados Unidos Nos 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner y col.; las Patentes de Estados Unidos Nos 5.427.908 y 5.580.717 de Dower y col.; las Patentes de Estados Unidos Nos 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty y col.; y las Patentes de Estados Unidos Nos 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths y col.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos después de la inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson y col.

### Inmunización de ratones de Ig humana

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

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

### Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglio linfático de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden explorarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, suspensiones de célula única de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con una sexta parte de la cantidad de células de mieloma de ratón no secretante P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) pueden fusionarse con PEG al 50 %. Las células se siembran en placa a

aproximadamente  $2 \times 10^5$  en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero Clonote fetal al 20 %, medio acondicionado "653" al 18 %, origen (IGEN) al 5 %, L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que el HAT se reemplaza con HT. Después pueden explorarse pocillos individuales por ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce el crecimiento del hibridoma extensivo, el medio puede observarse normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden volver a sembrarse en placa, explorarse de nuevo, y si son aún positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales puede subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces rotativos de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse a PBS y la concentración puede determinarse por DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y conservarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención

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

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

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, por Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles altos de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus del simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y poliovirus. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la  $\beta$ -globina. Adicionalmente aun, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor  $SR\alpha$ , que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos T humanos de tipo 1 (Takebe, Y. y col. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

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

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

Las células hospedadoras preferidas para expresar anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células que modifican la fucosilación de un anticuerpo expresado. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de tal manera que la célula hospedadora produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos, o una célula hospedadora que expresa glucosil transferasas de modificación de glucoproteínas de tal manera que los anticuerpos expresados en la célula hospedadora tienen un aumento de estructuras GlcNac de bisección que impiden la fucosilación. Otras células hospedadoras de mamífero en la célula hospedadora tienen estructura GlcNac de bisección aumentada que impide la fucosilación. Otras células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr- descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NS0, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos convencionales de purificación de proteínas.

#### Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti-CD30 defucosilado, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco, (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se denominan en este documento "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las destruya). Como ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, meclortamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y *cis*-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramina (AMC)) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas y sus derivados. En el comercio se dispone de un ejemplo de un conjugado de anticuerpo con caliqueamicina (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la invención usando tecnología de engarce disponible en la materia. Como ejemplos de tipos de engarces que pueden usarse para conjugar una citotoxina con un anticuerpo se incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y engarces que contienen péptidos. Puede seleccionarse un engarce que sea, por ejemplo, susceptible a escisión a pH bajo dentro del compartimento lisosomal

o susceptible a escisión por proteasas, tal como proteasas preferencialmente expresadas en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para un análisis adicional de tipos de citotoxinas, engarces y procedimientos para conjugar agentes terapéuticos a un anticuerpo, véase también Saito, G. y col. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo para generar compuestos radiofarmacéuticos citotóxicos, denominados también radioinmunoconjugados. Como ejemplos de isótopos radioactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso desde el punto de vista de diagnóstico o terapéutico se incluyen, pero sin limitación, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup> y lutetio<sup>177</sup>. En la técnica están establecidos procedimientos para preparar radioinmunoconjugados. Como ejemplos radioinmunoconjugados disponibles en el comercio, se incluyen Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals) y usando los anticuerpos de la invención pueden usarse procedimientos similares para preparar radioinmunoconjugados.

Los conjugados con anticuerpos de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica determinada, y el resto farmacológico no debe considerarse como limitante a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- $\gamma$ ; o, modificadores de respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos con antibióticos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results y Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

#### Composiciones farmacéuticas

También se describe una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una parte (o partes) de unión a antígeno, de la presente invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados, de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados) que se unen a diferentes epítopes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-neoplásico, antiinflamatorio o inmunosupresor. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINE), por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, tales como ibuprofeno (Motrin, Advilo), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), quetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro), indometacina (Indocin), y aspirina en elevadas dosis. Otros ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación se describen a continuación con mayor detalle en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

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

Los compuestos farmacéuticos pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) *J.*

Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanólicos fenil-sustituídos, ácidos hidroxialcanólicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N, N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

cantidades en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionada.

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

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

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

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

En ciertas realizaciones, los anticuerpos defucosilados de la invención pueden formularse para garantizar la apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófobos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesan la BBB (si se desea), estos pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, potenciado de este modo el suministro dirigido del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Restos ejemplares de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe y col. (1995) Am. J Physiol. 1233:134); p120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

#### Usos y procedimientos de la invención.

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

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

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

#### A. Procedimientos de detección.

En una realización, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar los niveles de CD30, o los niveles de células que contienen CD30 en su superficie de membrana, niveles que después pueden relacionarse con determinados síntomas de enfermedades.

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

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

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

#### B. Inhibición del crecimiento de células CD30+

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

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

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

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

Como agentes terapéuticos también pueden usarse células efectoras específicas de diana, por ejemplo, células efectoras relacionadas con composiciones de la invención. Las células efectoras para direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales y otras células que llevan receptores de IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto a tratar. Las células efectoras específicas de diana pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. La cantidad de células administrada puede ser del orden de  $10^6$ - $10^9$  pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CD30, y para realizar la destrucción celular, por ejemplo, por fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

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

#### C. Uso de inmunoconjugados y terapia de combinación.

En una realización, pueden usarse inmunoconjugados de la invención para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular CD30 ligando dichos compuestos al anticuerpo. Por tanto, la invención también proporciona procedimientos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CD30 (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático). Como alternativa, los inmunoconjugados pueden usarse para destruir células que tienen receptores de superficie celular CD30 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas contra CD30, tal como contra células tumorales que expresan CD30 para eliminar de este modo la célula tumoral, o contra células presentadoras de antígeno que expresan CD30 para eliminar de este modo las CPA como un medio para inhibir respuestas inmunitarias (por ejemplo, en trastornos autoinmunitarios).

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

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

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

#### D. Tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

Las composiciones pueden usarse *in vitro* o *in vivo* para tratar enfermedades mediadas por o en las que interviene CD30, por ejemplo, enfermedades caracterizadas por la expresión, típicamente sobre-expresión, de CD30 tales como enfermedades autoinmunitarias mediadas por macrófagos, neutrófilos activados, células dendríticas o células NK, tales como enfermedades autoinmunes tiroideas, tales como rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra huésped (EICH). La CD30 soluble se desprende regularmente de la superficie de células que expresan CD30 y se ha informado de altos niveles de sCD30 en el suero de pacientes con una diversidad de trastornos

tumorigénicos y autoinmunes. Por consiguiente, otro uso más de los anticuerpos de la invención incluye la prevención o tratamiento de enfermedades que implica el bloqueo o la inhibición del desprendimiento de sCD30.

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

#### *E. Tratamiento del cáncer*

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir en un sujeto el crecimiento células tumorales CD30+ (es decir, células tumorales que expresan CD30), en el que al sujeto se le administra un anticuerpo anti-CD30 defucosilado de la invención, de modo que se inhibe el crecimiento de las células tumorales CD30+. Para sujetos humanos, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano. En una realización preferida, las células tumorales son células tumorales de enfermedad de Hodgkin. En otra realización preferida, las células tumorales son células tumorales de linfomas de células grandes anaplásicas (LCGA). En otras realizaciones, las células tumorales puede ser de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfomas cutáneos de linfocitos T, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de linfocitos T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de linfocitos T (LLLT), leucemia de linfocitos T en el adulto (LLTA), cánceres de linfomas foliculares eritroblásticos/centrocíticos (eb/cc), linfomas de células grandes difusas de linaje B, linfoma de linfocitos T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (LDAI), linfoma de linfocitos T en el adulto (LTA), linfomas basados en cavidad corporal asociados a VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas indiferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi y otros linfomas de linfocitos T CD30+ y linfomas de linfocitos B CD30+.

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

#### Kits

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

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitación adicional.

#### **Ejemplo 1: Preparación y caracterización de anticuerpo monoclonal anti-CD30 defucosilado**

En este ejemplo, se expresó un anticuerpo monoclonal anti-CD30 completamente humano en una línea celular que carecía de una enzima fucosil transferasa de modo que la línea celular producía proteínas que carecían de fucosilo en sus carbohidratos. El anticuerpo defucosilado se ensayó frente a un anticuerpo anti-CD30 fucosilado (expresado en una línea celular diferente que contenía la enzima fucosil transferasa) para determinar las diferencias estructurales y características entre los anticuerpos, usando una diversidad de técnicas de análisis químicos, incluyendo electroforesis capilar, comparación de secuencias de aminoácidos, diferencias de masas por espectroscopía de masas y variación de carga por isoelectroenfoque capilar.

El anticuerpo monoclonal anti-CD30 completamente humano 5F11 se describió originalmente en la publicación PCT WO 03/059282. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la cadena pesada de 5F11 se muestran en la Figura 1A y las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la cadena ligera de SF11 se muestran en la Figura 1B. Las secuencias variables de cadena pesada y ligera de 5F11 se subclonaron en un vector de expresión. El ADNc de región variable kappa de 5F11, que incluye su secuencia señal y una secuencia Kozak óptima, se subclonó

en fase con la región constante kappa humana. El ADNc de la región variable de cadena pesada de 5F11, que incluye su secuencia señal y una secuencia Kozak óptima, se subclonó en fase con la región constante pesada  $\gamma$ 1 humana. La expresión tanto de la cadena ligera como de la pesada, estuvo dirigida por promotores de ubiquitina C humana (Nenoí, M. y col. Gene 175; 179, 1996). Este vector de expresión se describe con mayor detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 60/500.803, cuyo contenido se incorpora expresamente en este documento por referencia.

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

El ADN del vector a usar para la electroporación se precipitó con etanol y se resuspendió en Tris 7,6 10 mM, EDTA 1 mM. Se utilizaron 1, 5, 10, 15 o 20  $\mu$ g de ADN para veinte electroporaciones, cuatro electroporaciones por concentración de ADN. Las células Ms704 se prepararon por transfección lavando las células en una solución tamponada con sacarosa (STS) y resuspendiendo las células a  $1 \times 10^7$  células/ml de solución STS. Se mezclaron 400  $\mu$ l de células con el ADN de la construcción y se sometieron a electroporación usando ajustes a 230 voltios, 400 microfaradios de capacitancia y 13 ohms de resistencia (BTX Molecular Deliver y Systems N° 600 electromanipulador celular). Las células se retiraron de las cubetas de electroporación y se añadieron 20 ml de medio de crecimiento. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos usando 200  $\mu$ l de células por pocillo, aproximadamente  $4 \times 10^4$  células/pocillo. Dos días después de la electroporación, se extrajeron 150  $\mu$ l del medio de cada pocillo y se reemplazaron con 150  $\mu$ l de medio de selección, medio de crecimiento con 400  $\mu$ g/ml de G418 (Invitrogen N° 10131-035). Cada tres a siete días, se reemplazaron 150  $\mu$ l de medio de selección por pocillo con medio de selección reciente. Las células hospedadoras CHO DG44 (FUT 8 +/+) se sometieron a electroporación con la construcción 5F11 idéntica usando un procedimiento similar y se establecieron los transfectantes CHO DG44 que expresaban anticuerpo recombinante 5F11 que contenía carbohidratos fucosilados.

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

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

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

**Tabla 1: Análisis de monosacáridos**

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

Los resultados del análisis de monosacáridos confirman que el anticuerpo expresado en células Ms704 carece de restos fucosilo.

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

### Ejemplo 2: evaluación de la actividad CCDA del anticuerpo anti-CD30 defucosilado

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

A partir de sangre completa se prepararon células efectoras humanas del siguiente modo. A partir de sangre completa heparinizada se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana por separación convencional con Ficoll-paque. Las células se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía SBF al 10% y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente las células se recogieron y se lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a  $1 \times 10^7$  células/ml. Se incubaron dos millones de células CD30+ diana con 200  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  en 1 ml de volumen total durante 1 hora a 37 °C. Las células diana se lavaron una vez, se resuspendieron en 1 ml de medio, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación final, las células diana se lavaron una vez y se llevaron a un volumen final de  $1 \times 10^5$  células/ml.

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

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

El porcentaje de lisis se determinó mediante la siguiente ecuación:

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

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

**Tabla 2: Capacidad citotóxica del anticuerpo monoclonal anti-CD30 desfucosilado**

Célula diana	% de lisis	% de lisis	% de lisis proporción fucosa -: fucosa +	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	CE <sub>50</sub> proporción fucosa+: fucosa-
	Fucosa +	Fucosa -		Fucosa +	Fucosa -	
L540	42	68	1,61	0,042	0,009	4,7
Karpas	19	50	2,63	0,250	0,032	7,8
L428	20	43	2,15	0,100	0,009	11,1
L1236	4	13	3,25	1,218	0,045	27,1

El anticuerpo 5F11-desfuc mostró un porcentaje de lisis celular que varió de 1, 61 veces (para células L540) a 3, 25 veces (para células L1236) en comparación con el anticuerpo 5F11-fuc. Esta potencia aumentada del 5F11-desfuc produce una lisis celular medible a concentraciones de anticuerpo en las que el 5F11-fuc no tiene efecto medible. Por ejemplo, en células L1236, que tienen un bajo nivel de expresión de CD30, el 5F11-desfuc a 0, 1 µg/ml produce una lisis específica del 10%, mientras que el 5F11-fuc a la misma concentración no tiene efecto medible (véase la Figura 6). El anticuerpo 5F11-desfuc fue de 4, 7 veces (para células L540) a 27, 1 veces (para células L1236) más potente en actividad CCDA que el anticuerpo 5F1-fuc, medido por la proporción de valores de EC<sub>50</sub>.

### 10 Ejemplo 3: Evaluación de la actividad CCDA del anticuerpo anti-CD30

En este ejemplo, se ensayaron anticuerpos monoclonales anti-CD30 con respecto a la capacidad de destruir líneas celulares CD30+ en presencia de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) en un ensayo de citotoxicidad con fluorescencia. Se prepararon células efectoras humanas como se ha descrito anteriormente y el ensayo de CCDA se realizó como se ha indicado anteriormente. Como puede observarse en la Figura 9, cuando se usaba el anticuerpo anti-CD30 desfucosilado había actividad CCDA aumentada en comparación con el anticuerpo precursor anti-CD30. Además, el anticuerpo anti-CD30 desfucosilado fue más potente que el anticuerpo precursor como se pone de manifiesto por la CE<sub>50</sub> reducida en comparación con el anticuerpo precursor anti-CD30. El anticuerpo también fue más eficaz como se pone de manifiesto por el hecho de que el porcentaje máximo de lisis fue mayor para el anticuerpo anti-CD30 desfucosilado. Con cualquier anticuerpo, el anticuerpo anti-CD16 (3G8) inhibió de forma eficaz la CCDA, lo que sugiere que esta lisis estaba mediada por CD16.

### 15 Ejemplo 4: CCDA aumentada con células efectoras humanas

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

### 20 Ejemplo 5: Ensayo de CCDA que compara anticuerpo precursor y desfucosilado usando células efectoras de monos cinomolgo.

Se obtuvo sangre completa de monos cinomolgo. Con 50 U/ml de rIL-2 se estimularon glóbulos rojos de células de sangre periférica de cinomolgo sometida a lisis y se cultivaron durante una noche a 37 °C en medio RPMI1640 que contenía SBF al 10%. El día del estudio, las células de cinomolgo se resuspendieron en tampón de ensayo (RPMI1640, SBF al 10%, probenecid 2, 5 mM) a 1x10<sup>7</sup> células/ml. Las células diana CD30 positivas, Karpas 299, se marcaron, se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, probenecid 2, 5 mM, HEPES 20 mM), y se ajustaron a 1x10<sup>5</sup> células/ml para una proporción de células diana con respecto a efectoras de 1:50. El ensayo de CCDA se realizó como se ha descrito anteriormente. Se comparó la actividad del anticuerpo precursor anti-CD30 con la del anticuerpo desfucosilado usando células efectoras purificadas de sangre de cinomolgo. Se observó una actividad CCDA moderada con el anticuerpo precursor (de aproximadamente el 7-10% de lisis celular a 10 µg/ml). En cambio, el anticuerpo desfucosilado indujo un porcentaje de lisis significativamente mayor (de aproximadamente el 10-30% de lisis celular a 10 µg/ml) y una CE<sub>50</sub> reducida (véase la Figura 11).

### 30 Ejemplo 6: Análisis Scatchard de afinidad de unión de anticuerpos monoclonales anti-CD30 con células L540, células de sangre periférica activadas humanas y de mono cinomolgo

Se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos precursor y desfucosilado anti-CD-30. La afinidad de unión de los dos anticuerpos se comparó con la de células L540 CD30 positivas así como con la de células mononucleares de sangre periférica humana o de mono cinomolgo activadas con PHA/Con A.

Las células de sangre periférica humana o de mono cinomolgo se estimularon con 2 µg/ml de PHA, 10 µg/ml de Con A, y 50 U/ml de rIL-2 y se cultivaron durante 3 días en medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal (SBF) al 10% a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml. El día del estudio, las células se lavaron y se ajustaron a 2x10<sup>7</sup> células/ml en tampón de unión (RPMI1640 +FBS al 10%). Como control en estos estudios, se usaron células L540 CD30

positivas (ajustadas a  $4-8 \times 10^6$  células/ml) ya que expresan elevados niveles de antígeno. Las células se pusieron en hielo hasta el inicio del experimento. Se revistieron placas de filtro de fibra de vidrio Millipore (MAFBN0B50) con leche en polvo desnatada al 1% en agua y se conservaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con 0, 2 ml de tampón de unión. Se añadieron cincuenta microlitros de tampón solo a los pocillos de unión máxima (unión total). Se añadieron veinticinco microlitros de tampón solo a los pocillos de control. A todos los pocillos se añadió una concentración variable de  $^{125}$ I-anticuerpo anti-CD30 en un volumen de 25  $\mu$ l. Se añadieron concentraciones variables de anticuerpo no marcado a un exceso de factor 300-400 en un volumen de 25  $\mu$ l a pocillos de control (unión no específica) y a todos los pocillos se añadieron 25  $\mu$ l de células L540 CD30 positivas o células de sangre periférica humana o de mono cinomolgo estimuladas en tampón de unión. Las placas se incubaron durante 2 horas a 200 RPM en un agitador a 4 °C. Al completarse la incubación, las placas Millipore se lavaron dos veces con 0, 2 ml de tampón de lavado frío (RPMI1640, SBF al 10%, NaCl 500 mM). Los filtros se retiraron y se contaron en un contador gamma. La evaluación de la unión en equilibrio se realizó usando parámetros de unión de un único sitio con el programa informático Prism (San Diego, CA).

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

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

Tabla 3 Análisis de Scatchard

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

25

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

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

(continuación)

SEC ID Nº:	SECUENCIA	SEC ID Nº:	SECUENCIA
16	VK CDR1 a.a. 5F11	33	VK n.t. 5F11
17	VK CDR1 a.a. 17G1	34	VK n.t. 17G1
18	VK CDR1 a.a. 2H9	35	VK n.t. 2H9

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> MEDAREX, INC.
- <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD30 QUE CARECEN DE RESTOS FUCOSILO
- <130> MXI-333PC
- 10 <140> <141>
- <150> 60/654,197
- <151> 18-02-2005
- 15 <160> 35
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- 20 <210> 1
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1

```

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

- 30 <210> 2
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 2

ES 2 498 794 T3

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

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

5

<400> 3

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

10

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

15

<400> 4

ES 2 498 794 T3

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

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

5

<400> 5

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

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

10

15

<400> 6

ES 2 498 794 T3

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

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

Ala Tyr Tyr Trp Ser  
 1 5

10 <210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8

Asn Ser Trp Met Ser  
 1 5

15 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9

Gly Tyr Tyr Trp Ser  
 1 5

20 <210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10

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

35 <210> 11  
 <211> 17

ES 2 498 794 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

<210> 12  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

<210> 13  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

15  
Leu Thr Ala Tyr  
1

<210> 14  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

20  
Val His Trp Tyr Phe His Leu  
1 5

<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

25  
Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu  
1 5

<210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

30  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr  
1 5 10

<210> 17  
<211> 12  
<212> PRT

35  
55

ES 2 498 794 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

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

5

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

10

<400> 18

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

15

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

20

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

25

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

30

<400> 20

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5

35

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

40

<400> 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

45

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

50

<400> 22

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile Thr  
 1 5

55

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

<400> 23

ES 2 498 794 T3

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
 1 5

5  
 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr  
 1 5

10  
 15  
 <210> 25  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 25

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

20  
 25  
 <210> 26  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 26

ES 2 498 794 T3

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

5

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

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

10

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

15

<400> 28

ES 2 498 794 T3

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

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

5

<400> 29

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

10

<210> 30  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>  
 <221> CDS  
 222> (1)..(336)

20

<400> 30

ES 2 498 794 T3

cag	gtg	cag	cta	cag	cag	tgg	ggc	gca	gga	ctg	ttg	aag	cct	tcg	gag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5					10					15		
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	gct	gtc	tat	ggc	ggg	tcc	ttc	agt	gct	tac	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Ala	Tyr	
			20					25					30			
tac	tgg	agc	tgg	atc	cgc	cag	ccc	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	att	144
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35				40						45				
ggg	gac	atc	aat	cat	ggc	gga	ggc	acc	aac	tac	aac	ccg	tcc	ctc	aag	192
Gly	Asp	Ile	Asn	His	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	
50					55						60					
agt	oga	gtc	acc	ata	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aac	cag	ttc	tcc	ctg	240
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	
65					70					75					80	
aag	ctg	aac	tct	gta	acc	gcc	gcg	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	288
Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85				90						95		
agc	cta	act	gcc	tac	tgg	ggc	cag	gga	agc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	336
Ser	Leu	Thr	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
			100					105					110			

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

5

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

10

<400> 31

ES 2 498 794 T3

gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tct	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser	
20 25 30	
tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg	144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gcc aac ata aac gaa gat gga agt gag aaa ttc tat gtg gac tct gtg	192
Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc ttc tcc aga gac aac gcc gag aac tca ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg agg gtt cat tgg tac ttc cat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc	336
Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val	
100 105 110	
act gtc tcc tca	348
Thr Val Ser Ser	
115	

5 <210> 32  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(348)

<400> 32

ES 2 498 794 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

act gtc tcc tca                                     348
Thr Val Ser Ser
  115

```

5 <210> 33  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

<400> 33

ES 2 498 794 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

```

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

5

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

10

<400> 34

ES 2 498 794 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 35  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

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

10

<400> 35

```

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

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

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

```

ES 2 498 794 T3

tat	gat	gca	tcc	aac	agg	gcc	act	ggc	atc	cca	gcc	agg	ctc	agt	ggc	192
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Gly	
	50					55					60					
agt	ggg	tct	ggg	aca	gac	ttc	act	ctc	acc	atc	agc	agc	cta	gag	cct	240
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	
	65				70					75					80	
gaa	gat	ttt	gca	ggt	tat	tac	tgt	caa	cag	cgt	agc	aac	tgg	ccg	tgg	288
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Trp	
				85					90					95		
acg	ttc	ggc	caa	ggg	acc	aag	gtg	gaa	atc	aaa						321
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100						105							

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD30 monoclonal, defucosilado, aislado que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 7, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 10, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 13, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 16, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 19, y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 22.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que:
- (a) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1; y
- (b) la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 4.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo humano.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 conjugado con una citotoxina.
5. Una célula hospedadora que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-CD30 como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha célula hospedadora carece de una fucosiltransferasa, de tal manera que el anticuerpo anti-CD30 expresado por dicha célula hospedadora carece de restos de fucosa.
6. La célula hospedadora de la reivindicación 5, en la que los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana.
7. La célula hospedadora de la reivindicación 5 o 6, en la que dicha fucosiltransferasa es FUT8.
8. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que es una célula CHO.
9. Un procedimiento de inhibición *in vitro* del crecimiento de células CD30<sup>+</sup> que comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-CD30 defucosilado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de dichas células.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dichas células son células tumorales y/o dicho anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.
11. Un anticuerpo como se define en las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en un sujeto.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que las células tumorales son de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Hodgkin (EH), linfoma de células grandes anaplásicas (LCGA), linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfomas cutáneos de linfocitos T, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de linfocitos T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de linfocitos T (LLLT), leucemia de linfocitos T en adulto (LLT-A) y cánceres de linfomas foliculares eritroblásticos/centrocíticos (eb/cc), linfomas de células grandes difusas de linaje B, linfoma de linfocitos T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (LDAI), linfoma de linfocitos T en adulto (LTA), linfomas basados en cavidad corporal asociada con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas indiferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, linfomas de linfocitos T CD30+ y linfomas de linfocitos de B CD30+.

VH del anti-CD30 5F11

Segmento V: Locus: 4-34

Segmento D: Locus: - 7-27

Segmento J: JH4b

```

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

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

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

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

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

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

      T  V  S  S
325  ACC GTC TCC TCA
    
```

*Fig. 1A*

VL del anti-CD30 5F11

Segmento V: Locus: L15

Segmento J: JK5

```

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

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

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

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

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

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

      ↘ JK5
    
```

*Fig. 1B*

VH del anti-CD30 17G1

Segmento V: Locus: 3-07  
 Segmento D: No encontrado  
 Segmento J: JH2

```

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

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

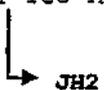
                                     CDR2
                                     -----
      V R Q A P G K G L E W V A N I N E D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC ATA AAC GAA GAT

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

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

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

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



*Fig. 2A*

VL del anti-CD30 17G1

Segmento V: Locus: A27

Segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

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

      ↓ JK1
    
```

*Fig. 2B*

VH del Anti-2H9 CD30

Segmento V: Locus: 4-34

Segmento D: Locus: 5-12

Segmento J: JH2

```

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

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

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

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

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

                                     CDR3
                                     ~~~~~
271 A V Y Y C A R E T V Y Y F D L W G R
   GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG ACT GTC TAC TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT
                                     ↓
                                     JH2

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

```

*Fig. 3A*

VL del anti-2H9 CD30

Segmento V: Locus: L6

Segmento J: JK1

```

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

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

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

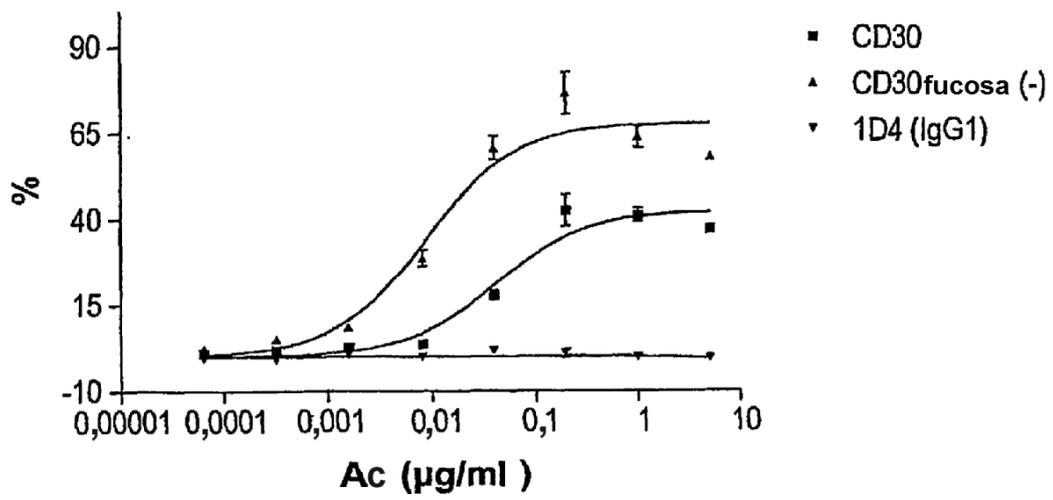
      CDR2
      -----
      A T G I P A R L S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG CTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

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

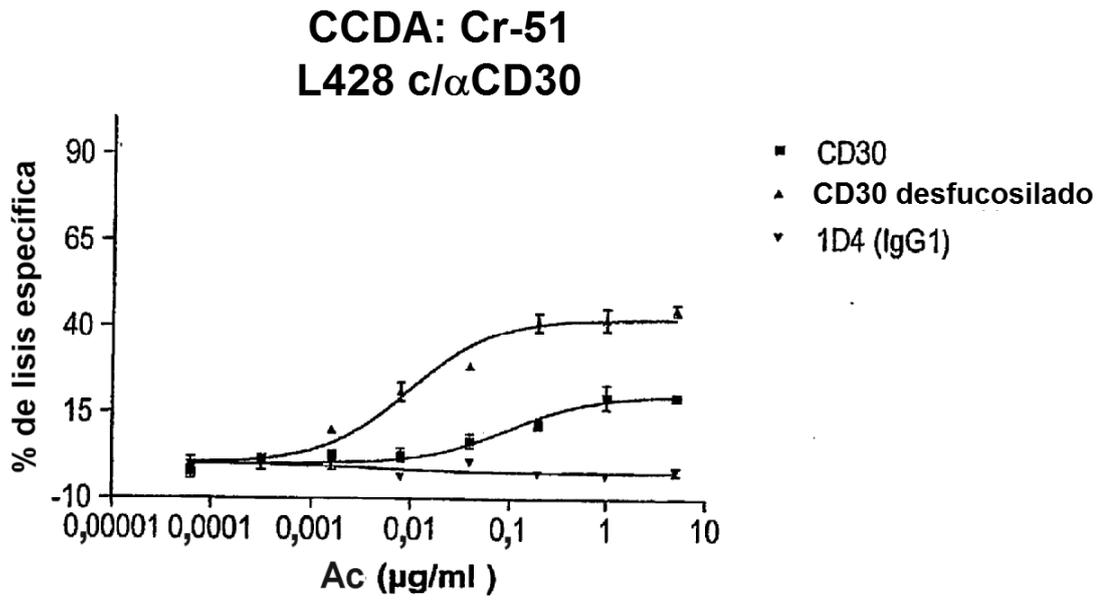
      CDR3
      -----
      R S N W P W T F G Q G T K V E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
      |
      | JK1
  
```

*Fig. 3B*

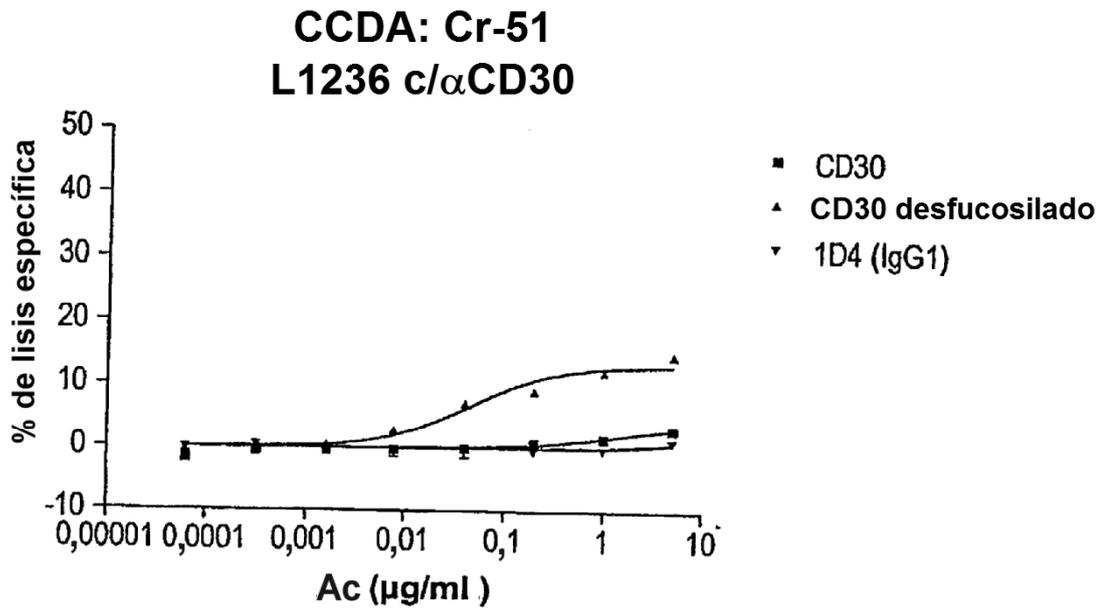
**CCDA: Cr  
L540 c/CD30**



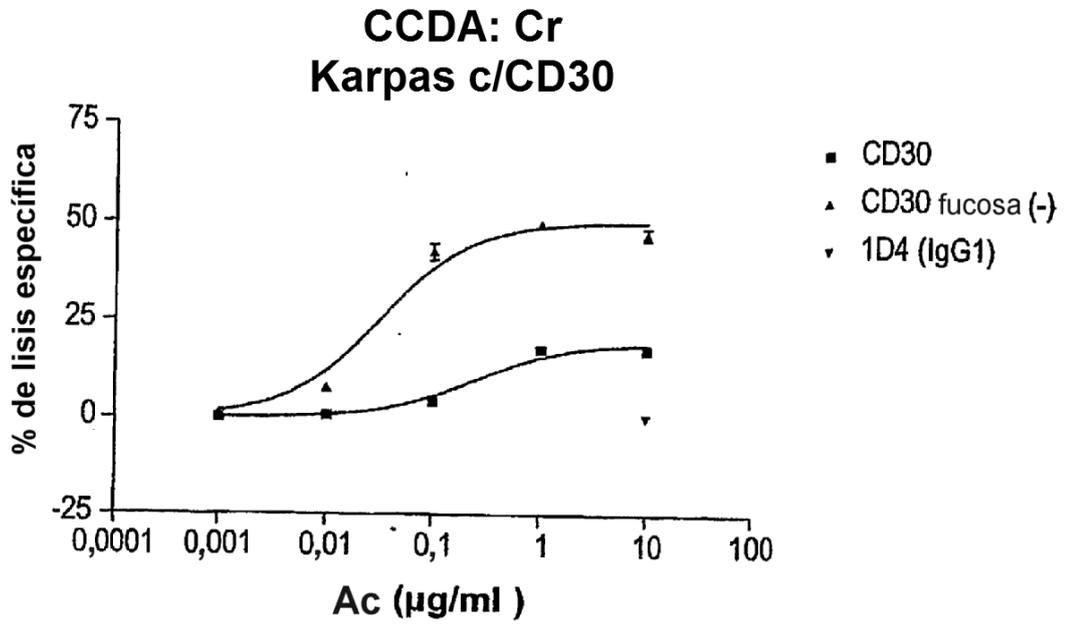
*Fig. 4*



*Fig. 5*



*Fig. 6*



*Fig. 7*

Secuencias de la línea germinal de cadena pesada

Línea germinal 4-34: Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S <sup>CDR1</sup> G Y Y W S

W I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L <sup>CDR2</sup> K S R V T I S

V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R <sup>CDR3</sup>

Línea germinal 3-07: E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M S W <sup>CDR1</sup>

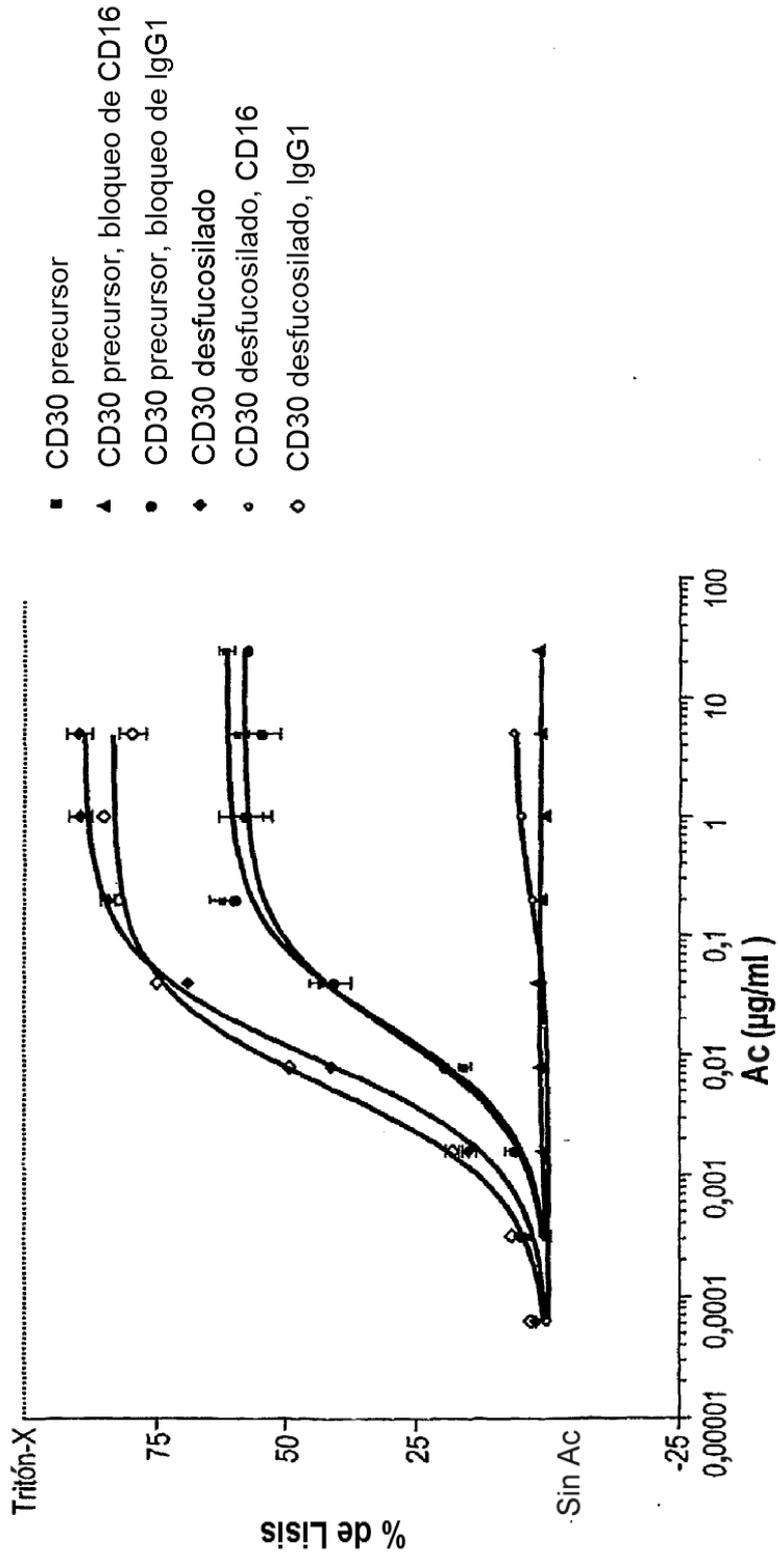
V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R <sup>CDR2</sup>

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

*Fig. 8A*



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

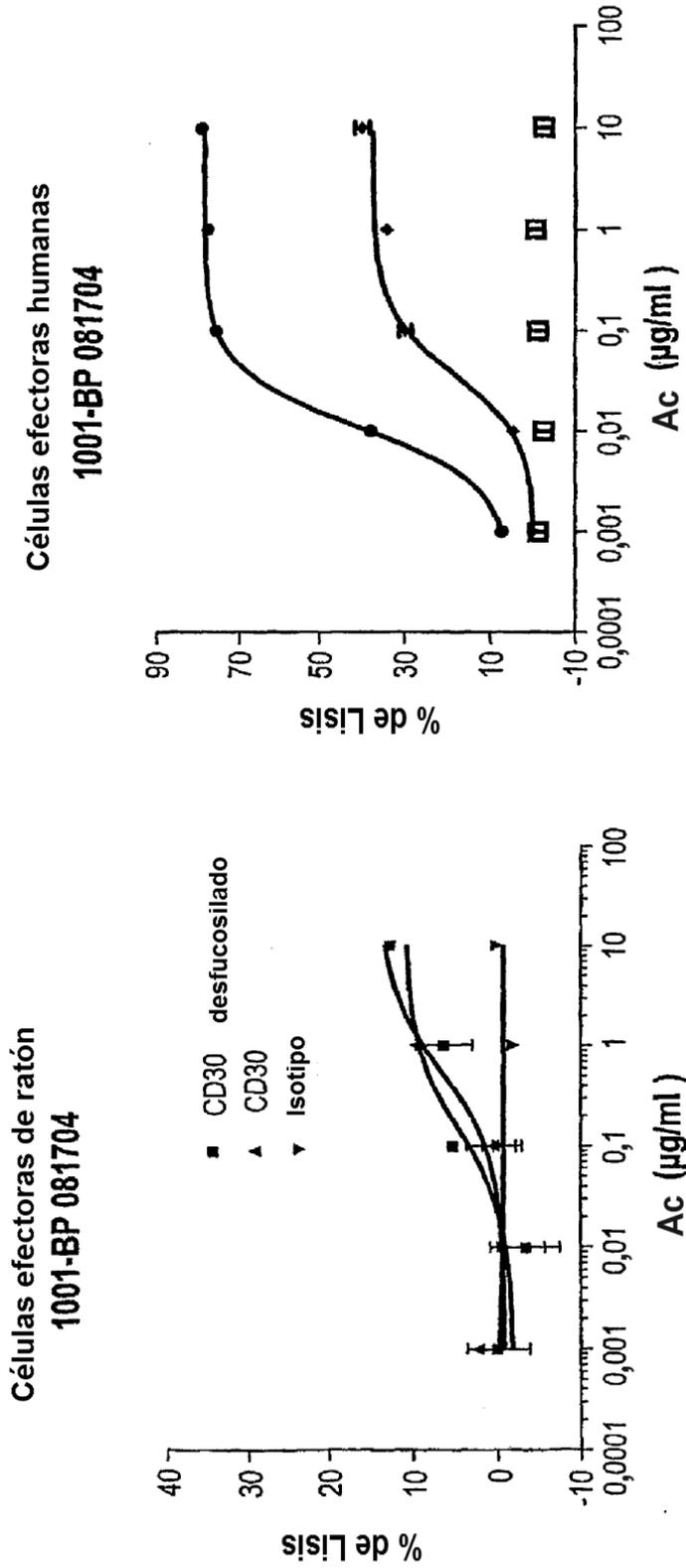


CE50	0,01811
	0,009528

CD30 precursor  
CD30 sin fucosa

Fig. 9

Comparación de ensayo CCDA con células efectoras de ratón y humanas



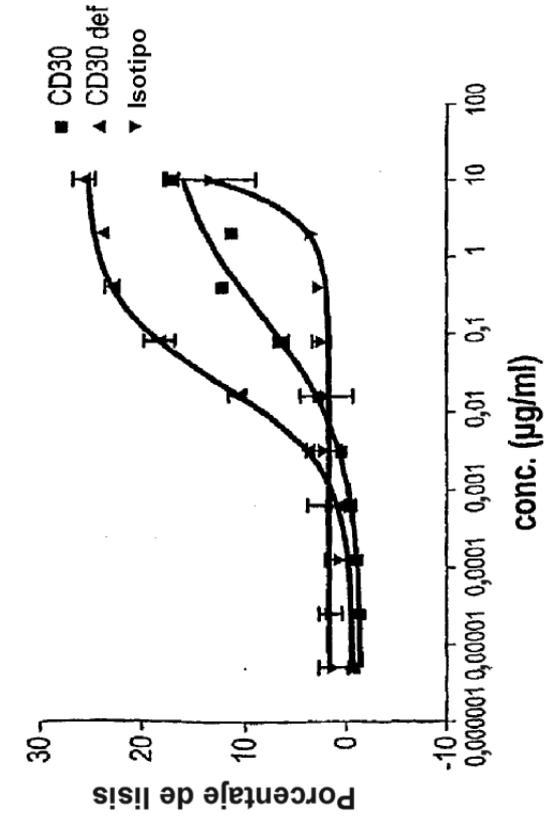
porcentaje específico = (muestra - sin Ac) / (Tritón-x sin Ac) x 100 %

Fig. 10

**Ensayo CCDA usando sangre de cinomolgo**

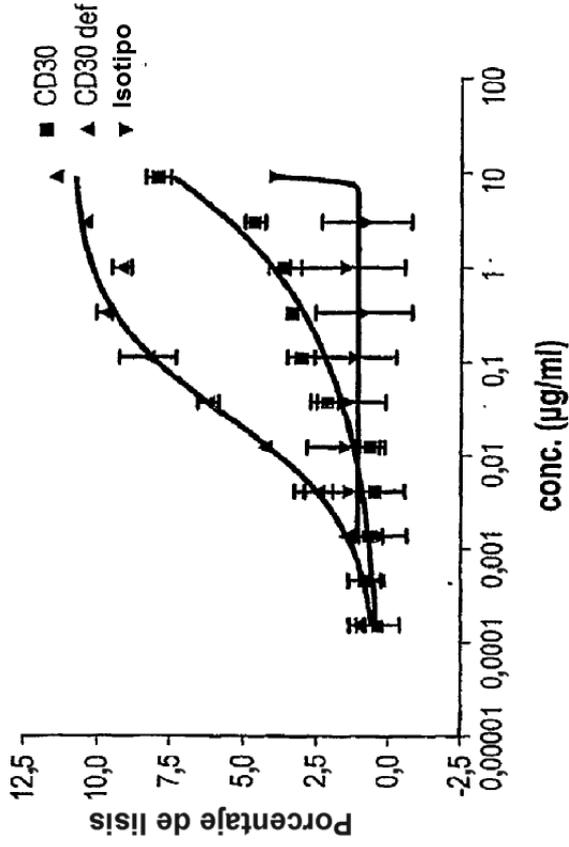
**Experimento n° 1**

CCDA de CD30 con células Karpas 299 y de cinomolgo  
 Proporción D/E 1:50  
 Tratamiento durante una noche con IL2 50 U/ml



**Experimento n° 2**

CCDA de CD30 con células Karpas 299 y de cinomolgo  
 Proporción D/E 1:50  
 Tratamiento durante una noche con IL2 50 U/ml



*Fig. 11*