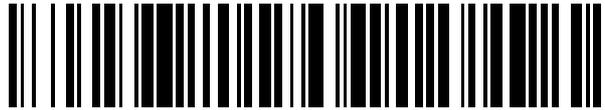


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 961**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06815627 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1934261**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos para CD70**

30 Prioridad:

26.09.2005 US 720600 P

13.10.2005 US 726695 P

08.12.2005 US 748827 P

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

02.02.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TERRETT, JONATHAN ALEXANDER;
LU, LI-SHENG;
KING, DAVID JOHN;
CARDARELLI, JOSEPHINE M.;
PAN, CHIN;
HUANG, HAICHUN y
COCCIA, MARCO A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 527 961 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 humanos para CD70

5 **Antecedentes**

El receptor de citosina CD27 es un miembro de la superfamilia del receptor de factor de necrosis de tumor (TFNR), que juega un papel en el crecimiento y diferenciación celular, también como apoptosis o muerte de la célula programada. El ligando para CD27 es CD70, que pertenece a la familia de ligando de factor de necrosis de tumor. CD70 es un polipéptido de 193 aminoácidos que tiene un dominio N-terminal hidrofílico de 20 aminoácidos y un dominio C-terminal que contiene dos sitios de glicosilación N-enlazados potenciales (Goodwin, R.G. *et al.* (1993) *Cell* **73**: 447-56; Bowman *et al.* (1994) *Immunol* **152**: 1756-61). Basándose en este elemento, se determinó que CD70 es un tipo de proteína de transmembrana II que tiene una porción C-terminal extracelular.

CD70 es encontrada transitoriamente en linfocitos T y B activados, pero no en reposo y células dendríticas (Insten *et al.* (1994) *J. Immunol.* **152**: 1762-1773; Oshima *et al.* (1998) *Int. Immunol.* **10**: 517-26; Tesselaar *et al.* (2003) *J. Immunol.* **170**: 33-40). Además de la expresión en células normales, la expresión de CD70 se ha reportado en diferentes tipos de cánceres en los que se incluyen carcinomas de célula renal, cánceres de pecho metastásico, tumores de cerebro, leucemia, linfomas y carcinomas nasofaríngeos (Junker *et al.* (2005) *J Urol.* **173**: 2150-3; Sloan *et al.* (2004) *Am J Pathol.* **164**: 315-23; Held-Feindt y Mentlein (2002) *Int J Cancer* **98**: 352-6; Hishima *et al.* (2000) *Am J Surg Pathol.* **24**: 742-6; Lens *et al.* (1999) *Br J Haematol.* **106**: 491-503). Adicionalmente, se ha encontrado que CD70 es sobreexpresado en células T tratadas con inhibidores de metiltransferasa de ADN o inhibidores de ruta de ERK, produciendo posiblemente a grupos inducidos por fármaco y grupos idiomáticos (Oelke *et al.* (2004) *Arthritis Rheum.* **50**: 1850-60). También se ha propuesto que la interacción de CD70 con CD27 juega un papel en la enfermedad autoinmune modulada por la célula y la inhibición de producción de TNF-alfa (Nakajuma *et al.* (2000) *J. Neuroimmunol.* **109**: 188-96).

Así, CD70 representa un objetivo valioso para el tratamiento de cáncer, alteraciones autoinmunes y otras varias enfermedades caracterizadas por la expresión de CD70.

30 **Sumario de la Invención**

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a CD70 y que exhiben numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen alta afinidad de enlace a CD70 humano. También se proporcionan métodos para el tratamiento de varias enfermedades moduladas por CD70 utilizando los anticuerpos y composiciones de la presente divulgación.

Se proporcionan en el presente documento:

- 40 - un anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende:
- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR1 como se muestra en la Figura 1A;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR2 como se muestra en la Figura 1A;
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR3 como se muestra en la Figura 1A;
 - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 como se muestra en la Figura 1B;
 - (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR2 como se muestra en la Figura 1B;
 - (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR3 como se muestra en la Figura 1B; en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70.
- 55 - un anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo en CD70 humano que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1A y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1B.
- 60 - un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, ligado a un agente terapéutico.
- una composición que comprende un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, o un inmunoconjugado de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención.
- 65 - un método para preparar un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención que comprende expresar el anticuerpo en una célula hospedadora.
- un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de

células tumorales.

- un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para tratar la inflamación.
- uso de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células tumorales o inhibir la inflamación.

5 Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de plena longitud, por ejemplo, de un isotipo IgG1 o IgG4. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab o Fab'2 o anticuerpos de una sola cadena.

10 El inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, enlazado a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radioactivo.

15 Además de moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención, también se proporcionan vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos, células huésped que comprenden tales vectores de expresión y muchos para fabricar anticuerpos anti-CD70 utilizando tales células huésped. Además, la divulgación proporciona un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humano, en el que el ratón expresa un anticuerpo de la invención, también como hibridomas preparados a partir de tal ratón, en el que el hibridoma produce el anticuerpo de la invención.

20 También se desvela un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad caracterizada por el crecimiento de células de tumor que expresan células CD70, que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo humano anti-CD70 de la invención en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la enfermedad. La enfermedad puede ser un cáncer, por ejemplo, cáncer de carcinoma de célula renal o linfoma.

25 Otros aspectos y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos y no deben ser interpretados como limitantes.

Breve descripción de las Figuras

30 La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 41) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 1) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2H5. Las regiones de CDR1 (SEC ID N°: 11), CDR2 (SEC ID N°: 16) y CDR3 (SEC ID N°: 21) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V y J.

35 La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 46) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 6) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2H5.

Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 26), CDR2 (SEC ID N°: 31) y CDR3 (SEC ID N°: 36) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V y J.

40 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 42) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 10B4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 12), CDR2 (SEC ID N°: 17) y CDR3 (SEC ID N°: 22) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V, D y J.

45 La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 47) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 7) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 10B4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 27), CDR2 (SEC ID N°: 32) y CDR3 (SEC ID N°: 37) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V y J.

50 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 43) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 3) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 8B5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 13), CDR2 (SEC ID N°: 18) y CDR3 (SEC ID N°: 23) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V, D y J.

55 La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 48) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 8) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 8B5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 28), CDR2 (SEC ID N°: 33) y CDR3 (SEC ID N°: 38) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V y J.

60 La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 44) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 18E7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 14), CDR2 (SEC ID N°: 19) y CDR3 (SEC ID N°: 24) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V, D y J.

65 La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 49) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 9) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 18E7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 29), CDR2 (SEC ID N°: 34) y CDR3 (SEC ID N°: 39) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V y J.

La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 45) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 5) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 69A7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 15), CDR2 (SEC ID N°: 20) y CDR3 (SEC ID N°: 25) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V, D y J.

La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 50) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 10)

de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 69A7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 30), CDR2 (SEC ID N°: 35) y CDR3 (SEC ID N°: 40) son delineadas y se indican las derivaciones de línea de germinación V y J.

La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2H5 y 10B4 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 51) de línea de germinación humana V_H3-30.3.

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 8B5 y 18E7 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 52) de línea de germinación humana V_H3-33.

La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 69A7 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 53) de línea de germinación humana V_H4-61.

La Figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2H5 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 54) de línea de germinación humana V_KL6.

La Figura 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 10B4 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 55) de línea de germinación humana V_KL18.

La Figura 11 muestra alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 8B5 y 18E7 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 56) de línea de germinación humana V_KL15.

La Figura 12 muestra alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 69A7 con la secuencia de aminoácido (SEC ID N°: 54) de línea de germinación humana V_KL6.

La Figura 13 muestra los resultados de experimentos de ELISA que muestran que anticuerpos monoclonales humanos contra CD70 de humano se enlazan específicamente a CD70.

La Figura 14 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que el anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 2H5 se une a líneas de células de carcinoma renales.

Las Figuras 15A y B muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra CD70 humano se enlazan de manera dependiente de la concentración a líneas de células de carcinoma de célula renal (RCC). (A) línea de células 786-O RCC, (B) línea de células A498 RCC.

La Figura 15C muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales de humano contra CD70 humano se unen a la línea de célula de carcinoma renal 786-O.

La Figura 15D muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que el anticuerpo 69A7 HuMAb contra CD70 humano se enlaza de manera dependiente de la concentración a líneas de células de carcinoma de célula renal (RCC).

La figura 16 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que el anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 2H5 se une a líneas de células de linfoma humano.

Las Figuras 17A y B muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que el anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 2H5 se une a líneas de células de linfoma humana de manera dependiente de la concentración. (A) línea de células de linfoma Raji, (B) línea de células de linfoma Granta-519.

La Figura 17C muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que anticuerpos monoclonales de humano contra CD70 humano se unen a la línea de células de linfoma de Raji.

La Figura 17D muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo de competencia que demuestra que los 2H5 HuMAbs y 69A7 comparten un epítipo de enlace similar.

La Figura 17E muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que anticuerpos monoclonales humanos contra CD70 humano se unen a la línea de células de linfoma de Daudi y línea de célula de carcinoma renal 786-O.

La Figura 18 muestra los resultados de experimentos de internalización Hum-Zap que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra CD70 humano se pueden internalizar a células CD70+.

Las Figuras 19A-C muestran los resultados de análisis de proliferación celular que demuestran que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos toxina-conjugados exterminan las líneas de célula de carcinoma de célula renal (RCC). (A) RCC de caki-2, (B) RCC de 786-O, (C) RCC ACHN.

Las Figuras 20A-D muestran los resultados de análisis de tipo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que demuestran que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos exterminan líneas de leucemia humana y líneas de células de linfoma de manera dependiente de ADCC. (A) línea de célula de leucemia ARH-77, (B) línea de célula de linfoma HuT 78, (C) línea de célula de linfoma de Raji y (D) línea de célula L-540 que no expresa CD70.

La Figura 21 muestra los resultados de un análisis de proliferación celular que demuestra que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos toxina-conjugados exterminan líneas de células de linfoma humana.

Las Figuras 22A-B muestran los resultados de un análisis de proliferación de células que demuestran que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos toxina-conjugados muestran citotoxicidad a células de Raji, (A) con un lavado de tres horas y (B) con un lavado continuo.

Las Figuras 23A-B muestran los resultados de un estudio de modelo de tumor de ratón *in vivo* que demuestra que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD70 toxina-conjugado 2H5 tiene un efecto inhibitorio directo sobre tumores de carcinoma de célula renal (RCC) *in vivo*. (A) tumores de RCC A-498, (B) tumores RCC ACHN.

Las Figuras 24A-F muestran los resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que demuestran que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos desfucosilados tienen citotoxicidad celular incrementada sobre células de leucemia humana de manera dependiente de ADCC. (A) células de ARH-77; (B) células de MEC-1; (C) células de MEC-1 tratadas con anticuerpo anti-CDF16; (D) células de SU-DHL-6; (E) células de IM-9; (F) células de HuT 78.

La Figura 25 muestra los resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

que demuestra que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos exterminan células de leucemia humana de manera dependiente de la concentración de ADCC.

La Figura 26 muestra los resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que demuestra que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos extermina células de leucemia humana de manera dependiente de ADCC, pero la citotoxicidad es dependiente de CD16.

La Figura 27 muestra los resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que demuestra que los anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos exterminan células T activadas humanas y el efecto es invertido con la adición del anticuerpo anti-CD16.

La Figura 28 muestra los resultados de un análisis de bloqueo que demuestra que algunos anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos bloquean el enlace de CD70 a CD27 y otros anticuerpos anti-CD70 monoclonales humanos no bloquean el enlace de CD70 a CD27.

Las Figuras 29A-B muestra los resultados de un estudio de modelo de tumor de ratón *in vivo* que demuestra que el tratamiento con anticuerpo anti-CD70 desnudo 2H5 tiene un efecto inhibitor directo sobre los tumores de linfoma *in vivo*. (A) tumores de Raji; (B) tumores de ARH-77.

Las Figuras 30A-C muestran los resultados de un estudio de modelo de tumor de ratón *in vivo* que demuestra que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD70 conjugado a toxina 2H5 tiene un efecto inhibitor directo sobre tumores de linfoma *in vivo*. (A) tumores ARH-77; (B) tumores Granta 519; (C) tumores de Raji.

La Figura 31 muestra los resultados de un estudio que demuestra que el anticuerpo anti-CD70 69A7 reacciona de manera cruzada con CD70 expresado en una línea de células de linfoma CD70+ B de mono rhesus.

La Figura 32 muestra los resultados de un análisis de bloqueo que demuestra que un anticuerpo anti-CD70 humano bloquea el enlace de un anticuerpo CD70 anti-humano de ratón conocido.

Las Figuras 33A y B muestran los resultados de tratamiento ya sea con anticuerpo anti-CD70 o la forma no fucosilada del anticuerpo. (A) anticuerpos anti-CD70 inhiben la proliferación de células co-estimuladas de CD740 de manera dependiente de la dosis. (B) anticuerpos anti-CD70 inhiben la secreción IFN- γ co-estimulada con CD70 de manera dependiente de la dosis.

Las Figuras 34A-C muestran los resultados de tratamiento ya sea con anticuerpo anti-CD70 o la forma no fucosilada del anticuerpo sobre células estimuladas en péptido. (A) Los anticuerpos anti-CD70 inhiben la expansión de linfocitos T de CD8+ específica de péptido. (B) No hubo ninguna reducción significativa de la viabilidad celular total observada. (C) No hubo ninguna reducción significativa de los números de células CD8+ totales observadas.

La Figura 35 muestra el efecto de anticuerpos anti-CD70 que con la expansión de células T CD8+ específicas de péptido es bloqueada con la adición de anticuerpos anti-CD16.

Las Figuras 36A-B muestran los resultados de un estudio de modelo de tumor de ratón *in vivo* que demuestra que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD70 toxina-conjugado 2H5 tiene un efecto inhibitor directo sobre tumores de carcinoma renal *in vivo* (A) tumores 786-O; (B) tumores Caki-1.

Descripción detallada de la Invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se enlazan específicamente a CD70 con alta afinidad. Los anticuerpos desvelados en el presente documento son derivados de secuencias de líneas de germinación de cadena pesada y ligera particulares y/o comprenden aspectos estructurales particulares tales como regiones de CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La presente divulgación describe anticuerpos aislados, métodos de fabricación de tales anticuerpos, inmunocombinados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunocombinados o moléculas biespecíficas de la divulgación. La presente divulgación también describe métodos de uso de los anticuerpos, tales como para tratar enfermedades tales como cáncer.

Con el fin de que la presente divulgación pueda ser entendida más fácilmente, se definen ciertos términos. Definiciones adicionales son resumidas en torno a la descripción detallada.

Una "ruta de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señal que juegan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se usa en la presente, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de tal señal a través de la membrana de plasma de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente divulgación es el receptor CD70.

El término "anticuerpo" como se hace referencia en la presente incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de enlace de antígeno (esto es, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada consiste de tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera consiste de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera consiste de un dominio C_L. Las regiones V_H y V_L pueden ser subdivididas adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones que determinan

5 implementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de estructura (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR dispuestas del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden moderar el enlace de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, en los que se incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

10 El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o “porción de anticuerpo”), como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la habilidad para enlazarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD70). Se ha demostrado que la función de enlace de antígeno de un anticuerpo puede ser efectuada por fragmentos de un anticuerpo de plena longitud. Ejemplos de fragmentos de enlace abarcándose el término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen: (i) un fragmento de Fab, un fragmento monovalente que consiste 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 enlazados por un puente de disulfuro en la región de engozne; (iii) un fragmento de Fab que es esencialmente un Fab con parte de la región de engozne (véase, *Fundamental Immunology* (Paule d. 3ª edición, 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste de un dominio V_H y (vii) una región que determina la complementariedad (CDR) aislada. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H son codificados por genes separados, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que le permite ser elaborados como una cadena de proteína individual en la cual el par de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); véase por ejemplo, Brid *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426 y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85: 5879-5883). Se pretende que tales anticuerpos de una sola cadena estén abarcados con el término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos son obtenidos utilizando técnicas convencionales conocidas para aquellos de habilidad en el arte y los fragmentos son seleccionados en cuanto a utilidad de la misma manera como lo son los anticuerpos intactos.

30 Un “anticuerpo aislado”, como se usa en la presente, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado si se une específicamente a CD70 está sustancialmente libre de anticuerpos que se enlazan específicamente a antígenos diferentes que CD70). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD70, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de CD70 de otra especie. En ciertas modalidades, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD70 humano no reacciona de manera cruzada con otros antígenos CD70 no humanos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o compuestos químicos.

40 Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente se refieren a una comparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una sola especificidad de enlace y afinidad por un epítipo particular.

45 El término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones de estructura como de CDR son derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea de germinación humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también es derivada de secuencias de inmunoglobulina de líneas de generación humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones posteriores, en las que se incluyen modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de líneas de generación humana (por ejemplo, mutaciones introducidas al azar o mutagénesis específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano” como se usa en la presente, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea de generación de otra especie de mamífero, tales como un ratón, han sido insertadas sobre secuencias de estructuras humanas.

55 El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que exhiben una sola especificidad de enlace que tiene regiones variables en las cuales tanto las regiones de estructura como de CDR son derivadas de secuencias de inmunoglobulina de líneas de germinación humana. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos 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 transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

60 El término “anticuerpo humano recombinante” como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado del mismo (descrito además posteriormente en la presente), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo humano de combinación recombinante y (d) anticuerpos

5 preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que ilustran el empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones de estructura y CDR son derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea de germinación humana. Sin embargo, en ciertas modalidades, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in Vitro* (o cuando un animal transgénico por secuencias de Ig humanas es usado, mutagénesis somática *in vivo*) y así las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes con secuencias que, en tanto que son derivadas de y relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de línea de germinación humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de línea de germinación de anticuerpo humano *in vivo*.

10 Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a una clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por los genes de región constante de cadena pesada.

15 Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" son usados intercambiamente en la presente con el término "un anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno".

El término "derivado de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado de anticuerpo y es otro agente o anticuerpo.

20 El término "anticuerpo humanizado" se propone referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea de germinación de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas sobre secuencias de estructura humanas. Las modificaciones de regiones de estructura adicionales pueden ser realizadas dentro de las secuencias de estructura humanas.

25 El término "anticuerpo quimérico" se propone referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable son derivadas de una especie y las secuencias de región constante son derivadas de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable son derivadas de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante son derivadas de un anticuerpo humano.

30 Como se usa en la presente, un anticuerpo que "se une específicamente a CD70 humano" se propone referirse a un anticuerpo que se une a CD70 humano con una K_D de 5 x 10⁻⁸ M o menor, más preferible 1 x 10⁻⁸ M o menor, más preferiblemente 6 x 10⁻⁹ M o menor, más preferiblemente 6 x 10⁻⁹ M o menor, aún más preferiblemente 2 x 10⁻⁹ M o menor.

35 El término "K_{asoc}" o "K_a" como se usa en la presente, se propone para referirse a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "K_{dis}" o "K_d", como se usa en la presente, se propone para referirse a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término "K_D", como se usa en la presente, se propone para referirse a la constante de disociación, que es obtenida de la proporción de K_d a K_a (esto es, K_d/K_a) y es expresado como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden ser determinados utilizando métodos bien establecidos en el arte. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es al utilizar resonancia de plasmón superficial, preferiblemente utilizando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

45 Como se usa en la presente, el término "alta afinidad" por un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menor, más preferiblemente, 10⁻⁸ M o menor, más preferiblemente 10⁻⁹ M o menor y aún más preferiblemente 10⁻¹⁰ M o menor para un antígeno objetivo. Sin embargo, el enlace de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos, por ejemplo, el enlace de "alta afinidad" por un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menor, más preferiblemente de 10⁻⁸ M o menor, más preferiblemente 10⁻⁹ M o menor.

50 Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "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, peces, reptiles, etc.

55 Varios aspectos de la divulgación son descritos en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-CD70

60 Los anticuerpos desvelados en el presente documento son caracterizados por aspectos o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se enlazan específicamente a CD70 humano.

65 Preferiblemente, un anticuerpo como se desvela en el presente documento se une a CD70 con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 5 x 10⁻⁷ M o menor, aún más preferiblemente 5,5 x 10⁻⁹ M o menor, aún más preferiblemente 3 x 10⁻⁹ M o menor, aún más preferiblemente 2 x 10⁻⁹ M o aún más preferiblemente 1,5 x 10⁻⁹ M o menor. Análisis estándar para evaluar la habilidad de enlace de los anticuerpos hacia CD70 son conocidos en el arte, en los que se incluyen por ejemplo, ELISA, Transferencia de Western y RIA. Análisis apropiados son descritos en detalle en los

ejemplos. La cinética de enlace 8por ejemplo, afinidad de enlace) de los anticuerpos puede también ser determinada mediante análisis estándar conocidos en el arte, tales como mediante ELISA, Scatchard y Biacore. Como otro ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden enlazar a una línea de células de tumor de carcinoma renal, por ejemplo, las líneas celulares 786-O, A-498, ACHN, Caki-1 o Caki-2. Como todavía otro ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden enlazar a una línea de células de tumor de células B, por ejemplo, las líneas de células Daudi, HuT 78, Raji o Granta 519.

Anticuerpos monoclonales 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7

Anticuerpos ejemplificados incluyen los anticuerpos monoclonales humanos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos V_H de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en las SEC ID N°: 6,7, 8, 9 y 10, respectivamente.

Una combinación de cadena pesada y ligera preferida es:

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

Se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 o combinaciones de estas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 11, 12, 13, 14 y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 16, 17, 18, 19 y 20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 21, 22, 23, 24 y 25, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_K de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_K de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_K de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente. Las regiones de CDR son delineadas utilizando el sistema de Rabat (Rabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Se proporciona en el presente documento: un anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo que comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 11;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 16;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 21;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 26;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 31; y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 36.

El anticuerpo se une específicamente a CD70, preferiblemente CD70 humano. También se desvela en el presente documento un anticuerpo que comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 12;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 17;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 22;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 27;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 32; y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 37;

o

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 13;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 18;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 23;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 28;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 33; y

(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 38;

o

- 5 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 14;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 19;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 24;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 29;
- 10 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 34; y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 39;

o

- 15 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 15;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 20;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 25;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 30;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 35; y
- 20 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 40.

Anticuerpos que tienen secuencias de línea de germinación particulares

Se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea de germinación particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea de germinación particular.

Por ejemplo, se desvela en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivada de un gen V_H 3-30.3 de humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70. También se desvela un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivada de un gen V_H 3-30.3 de humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70. También se desvela un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen V_H 4-61 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70. También se desvela un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivada de un gen V_KL6 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70. También se desvela un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivada de un gen V_K L18 de humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70. También se desvela un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivada de un gen V_K L15 de humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70.

También se desvela un anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo:

- 45 (a) comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivada de un gen V_H 3-30.3, 3-33 o 4-61 (tales genes codifican las secuencias de aminoácidos recibidas en SEC ID N°: 52m 52 y 53, respectivamente);
- 50 (b) comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivada de un gen V_K L6, L18 o L15 (tales genes codifican las secuencias de aminoácidos resumidas en SEC ID N°: 54, 55 y 56, respectivamente); y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a CD70.

Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H-3-30.3 y V_K L6, respectivamente, es 2H5. Un ejemplo de anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H-3-30.3 y V_K L18, respectivamente, es 10B4. Ejemplos de anticuerpos que tienen que tiene V_H y V_K de V_H-3-33 y V_K L15, respectivamente, son 8B5 y 18E7. Un ejemplo de anticuerpo que tiene que tiene V_H y V_K de V_K de 4-61 y V_K L6, respectivamente, es 69A7.

Como se usa en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones valiosas de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivada de" una secuencia de línea de germinación particular si las regiones variables del anticuerpo son obtenidas de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea de germinación humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humano con el antígeno de interés o seleccionar una biblioteca de gen de inmunoglobulina humana desplegada sobre fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea de germinación humana puede ser identificado como tal al comparar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias e aminoácidos de inmunoglobulina de línea de germinación humanas y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea de germinación humana que es más cercana en secuencia (esto es, % de

identidad mayor) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es “el producto de” o “derivado de” una secuencia de inmunoglobulina de línea de germinación humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea de germinación, debido por ejemplo, a mutaciones somáticas que se concentran de maneras estable en la naturaleza o introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado comúnmente es por lo menos 90 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea de germinación de humano y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano por ser humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea de germinación de otra especie (por ejemplo, secuencias de línea de germinación murinas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser por lo menos 95 % o aún por lo menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea de germinación. Comúnmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal de humano particular no exhibirá más de diez diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea de germinación de humano. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede exhibir no más de 5 o aún no más de 4, 3, 2 o una diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea de germinación.

Anticuerpos homólogos

También se desvela un anticuerpo que comprende regiones variables de cadenas pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD70 de la divulgación. En particular, el anticuerpo se une específicamente a CD70.

Como se usa en la presente, el por ciento de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al por ciento de identidad entre las dos secuencias. El por ciento de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, % homología = N° de posiciones idénticas/total de N° de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del por ciento de identidad entre dos secuencias se puede efectuar utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes posteriormente en la presente.

El por ciento de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Millar (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)) que ha sido incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12 y una penalidad de espacio de 4. Además, el por ciento de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado utilizando el algoritmo de Needman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)) que ha sido incorporado al programa en el GAP en el paquete de elementos de programación de GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando ya sea una matriz de Blossum 62 o una matriz de PAM250 y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente divulgación pueden ser usadas como una “secuencia de interrelación” para efectuar una búsqueda en las bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden ser efectuadas utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10. Búsquedas de proteína de BLAST pueden ser efectuadas con el programa XBLAST, interacción = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la divulgación. Para obtener alineaciones con espacios por propósitos de comparación, se puede utilizar BLAST con espacio o como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Acid Nucleic Res.* 25(17): 33389-3402. Cuando se utilizan los programas de BLAST y BLAST con espacio, los parámetros determinados de los programas respectivos (por ejemplo, BLAST y NBLAST) pueden ser usados. Véase <http://www.ncbi.nih.gov>.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que anticuerpos anti-CD70 de la divulgación

También se desvelan anticuerpos que se unen al mismo epítipo de CF70 humano como cualquiera de los anticuerpos monoclonales CD70 de la invención (esto es, anticuerpos que tienen la habilidad para competir de manera cruzada por la unión con CD70 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). El anticuerpo de referencia para estudios de competencia cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 2H5 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEC ID N^o: 1 y 6, respectivamente). Tales anticuerpos de competencia cruzada pueden ser identificados basándose en su habilidad para competir de manera cruzada con 2H5 en análisis de enlace CD70 estándar. Por ejemplo, se pueden usar análisis de BIAcore, análisis e ELISA o citometría de flujo para demostrar la competencia cruzada con los anticuerpos de la presente divulgación. La habilidad de un anticuerpo de prueba para inhibir el enlace de, por ejemplo, 2H5, a CD70 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con 2H5 por la unión con CD70 humano y así se une al mismo epítipo sobre CD70 humano como 2H5. En una modalidad preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre CD70 humano como 2H5 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden ser preparados y aislados como se describe en los Ejemplos.

Propiedades físicas del anticuerpo

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden ser caracterizados adicionalmente por las varias propiedades físicas de los anticuerpos. Varios análisis pueden ser usados para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden contener uno o más sitios de glicosilación ya sea en la región variable de cadena ligera y pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable pueden dar como resultado inmunogenicidad incrementada del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a enlace de antígeno alterado (Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* **41**: 673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* **172**: 5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J Exp Med* **168**: 1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* **12**: 43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* **316**: 452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* **37**: 697-706). Se ha conocido que la glicosilación ocurre en porciones que contienen una secuencia N-X-S/T. la glicosilación de región variable puede ser probada utilizando un análisis de Glicoinmunoevaluación, que escinde el anticuerpo para producir un Fab y luego pruebas en cuanto a glicosilación utilizando un análisis que mide la oxidación de peryodato y formación de base de Schiff. Alternativamente, la glicosilación de región variable puede ser formada utilizando cromatografía de luz de Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab monosacáridos y analiza el contenido de sacáridos individual. En algunas instancias, es preferido tener un anticuerpo que no contiene glicosilación de región variable. Esto puede ser obtenido ya sea al seleccionar anticuerpos que no contienen la porción de glicosilación en la región variable o mediante mutación de residuos dentro de la porción de glicosilación utilizando técnicas estándar bien conocidas en el arte.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Una desamidación o efecto de ácido aspártico puede ocurrir en las secuencias de N-G o D-G, respectivamente. La desamidación o efecto de ácido isoaspártico da como resultado la creación de ácido isoaspártico que disminuye la severidad de un anticuerpo al crear una estructura aplastada o torcida de un término de carboxi de cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico puede ser medida utilizando un análisis iso-cuántico, se utiliza una muestra HPLC de fase inversa para probar el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico (pI) único, pero en general los anticuerpos caerán en el intervalo de pH de entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 cae comúnmente dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 cae comúnmente dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos que han de tener un pI que está fuera de este intervalo. Aunque los efectos son en general desconocidos, se especula que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal puede tener algo de despliegue e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico puede ser probado utilizando un análisis de enfoque isoeléctrico capilar, que crea un gradiente de pH si puede utilizar enfoque de láser para una exactitud incrementada (Janini *et al.* (2002) *Electrophoresis* **23**: 1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* **53**: S75-89; Hunt *et al.* (1998) *J Chromatogr A* **800**: 355-67). En algunas instancias, es preferido tener un anticuerpo anti-CD19 que contiene un valor de pI que cae en el intervalo normal. Esto se puede obtener ya sea al seleccionar anticuerpos con un pI en el intervalo normal o al mutar residuos de superficie cargados utilizando técnicas estándar bien conocidas en el arte.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicadora de estabilidad térmica (Krishnamurthy R. y Manning, MC (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol* **3**: 361-71). Una estabilidad térmica más alta indica mayor estabilidad de anticuerpo global *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede ser leído utilizando técnicas tales como calorimetría de barrido diferencial (Chen *et al.* (2003) *Pharm Res* **20**: 1952-60; Ghirlando *et al.* (1999) *Immunol Lett* **68**: 47-52). La T_{M1} indica la temperatura del despliegue inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del despliegue completo del anticuerpo. En general, es preferido que la T_{M1} de anticuerpos de la presente divulgación sea mayor de 60 °C, preferiblemente mayor de 65 °C, aún más preferiblemente mayor de 70 °C. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede ser medida utilizando difracción circular (Murria *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* **40**: 343-9).

Pueden seleccionarse anticuerpos desvelados en el presente documento que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-CD19 puede ser medida utilizando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS como es bien entendido en el arte (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* **67**: 3626-32).

Pueden seleccionarse anticuerpos desvelados en el presente documento que tienen efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir al disparo de una respuesta inmune indeseable y/o propiedades hematocriticas alteradas o desfavorables. En general, los anticuerpos son aceptables con agregaciones de 25 % o menos, preferiblemente 20 % o menos, incluso más preferiblemente 15 o menos, aún más preferiblemente 10 % o menos y aún más preferiblemente 5 % o menos. La agregación puede ser medida mediante varias técnicas bien conocidas en el arte, en las que se incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de columna de exclusión de tamaño (SEC) y extracción de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos en la divulgación

También se desvelan en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la divulgación. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es “aislado” o “se vuelve expresamente puro” cuando es purificado de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar en las que se incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis de gel de azarosa y otros bien conocidos en el arte. Véase F. Ausubel *et al.*, ed (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing ADN Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o puede no contener secuencias intrónicas. Preferentemente, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Ácidos nucleicos pueden ser obtenidos utilizando técnicas de biología molecular estándar. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humanos como se describe posteriormente en la presente), ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo elaborados por el hibridoma pueden ser obtenidos mediante técnicas de amplificación de PCR o clonación de ADNc estándar. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca de gen de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de despliegue de fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede ser recuperado de la biblioteca.

Se desvelan en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de VH y VL de los anticuerpos monoclonales 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 o 69A7. Secuencias de ADN codifican las secuencias de VH de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 41,42, 43, 44 y 45, respectivamente. Las secuencias de AFN que codifican las secuencias de VL de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 son mostradas en SEC ID N°: 46, 47, 48, 49 y 50, respectivamente. Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de VH y VL son obtenidos, estos fragmentos de ADN pueden ser manipulados adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinantes estándar, por ejemplo, para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de plena longitud, a genes de fragmento Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH es enlazado alternativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una reacción constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término “enlazado operativamente” como se usa en este contexto, se propone dar a entender que los dos fragmentos de ADN son unidos de tal manera que las secuencias de aminoácido identificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en cuadros.

El ADN aislado que codifica la región VH puede ser convertido a un gen de cadena pesada de plena longitud al enlazar operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humano son conocidas en el arte (véase por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden ser obtenidos mediante amplificación de PCT estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente una región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Para un gen de cadena pesada del fragmento de Fab, el ADN que codifica para VH puede ser enlazado operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante de CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región de VL puede ser convertido a un gen de cadena ligera de plena longitud (también como un gen de cadena ligera de Fab) al enlazar operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera de humano son conocidas en el arte (véase por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins Of Immunological Interest*, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y fragmentos de AND que abarcan estas regiones pueden ser obtenidos mediante amplificación PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL son enlazados operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal manera que las secuencias de VH y VL pueden ser expresadas como una proteína de una sola cadena continua, con las regiones de VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85: 5879-5883; McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348: 552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden ser producidos mediante varias técnicas, en las que se incluyen metodología de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de célula somática estándar de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque los requerimientos de hibridación de célula somática son preferidos, en principio, otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal pueden ser usadas, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema de animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en el arte. Los socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murina) y procedimientos de fusión son también conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados pueden ser preparados basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede ser obtenido del hibridoma murino de interés y diseñado para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) utilizando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden ser enlazadas a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en el arte (véase por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4.816.567 expedida a Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de CDR murinas pueden ser insertadas a una estructura humana utilizando métodos conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5.225.539 expedida a Winter y Patentes Estadounidenses Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 expedidas a Queen *et al.*).

Los anticuerpos de la invención generados utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en la presente como ratón HuMAB® y ratones KM®, respectivamente y son denominados colectivamente en la presente como "ratones Ig humanos".

El ratón HuMAB® (Medarex, Inc.) contiene minisitos de gen de inmunoglobulina humanos que codifican secuencias de inmunoglobulina murina de cadena pesada (μ y γ) y cadenas ligeras κ sin arreglar, conjuntamente con mutaciones apuntadas que inactivan el sitio de cadena κ y μ endógeno (véase por ejemplo, Lonberg *et al.* (1994) *Nature* **368**(6474): 856-869). Así, los ratones exhiben expresión reducida de IgM de ratón o κ y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos sufren con mutación de clase y mutación somática para generar IgG κ humano de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* 1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* **113**: 49-101; Lonberg, N. y Juszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* **13**: 65-93 y Harding F. y Lonberg, N. (1995) *Am N.Y. Acad. Sci.* **764**: 536-546). La preparación y uso de ratones HuMab y las modificaciones genómicas efectuadas por tales ratones, se describen adicionalmente en Taylor L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* **20**: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *Internacional Immunology* **5**: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **90**: 3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* **4**: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* **152**: 2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *Internacional Immunology* **6**: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851. Véase además, Patentes Estadounidenses Nos. 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 expedidas a Lonberg y Kay; Patente Estadounidense No. 5.545.807 expedida a Zurrán *et al.*; Publicaciones PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas expedidas a Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 expedida a Korman *et al.*

Los anticuerpos pueden ser seriados utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humano. Tales ratones, denominados en la presente como el "KM Mouse®" son descritos en detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 expedida a Ishida *et al.*

Todavía además, sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humanos están disponibles en el arte y pueden ser usados para criar anticuerpos anti-CD70. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo denominado como el Xenomouse (Abgenix, Inc.) puede ser usado; tales ratones son descritos en, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 expedidas para Kucherlapati *et al.*

Además, sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humanos están disponibles en el arte y pueden ser usados para criar anticuerpos anti-CD70. Por ejemplo, los ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humano y un transcromosoma de cadena ligera humano, denominados como "ratones TC" pueden ser usados; tales ratones son descritos en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **97**: 722-727. Como otro ejemplo, vacas que portan transcromosoma de cadena pesada y ligera humanos han sido descritos en el arte (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* **20**: 889-894) y pueden ser usados para criar anticuerpos anti-CD70.

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden también ser preparados utilizando métodos de despliegue de fagos para seleccionar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humanos. Tales métodos de despliegue de fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en el arte. Véase, por ejemplo: Patentes Estadounidenses Nos. 5.223.409; 5.403.484 y 5.571.698 expedidas a Ladner *et al.*; Patentes Estadounidenses Nos. 5.427.908, y 5.580.717 expedidas a Dower *et al.*; Patentes Estadounidenses Nos. 5.969.108 y 6.172.197 expedidas a McCafferty *et al.*; y Patentes Estadounidenses Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 expedidas a Griffiths *et al.*

Anticuerpos monoclonales humanos pueden también ser preparados utilizando ratones SCID a los cuales células inmunes humanas han sido reconstituidas, de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano después de la inmunización. Tales ratones son descritos por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.476.996 y 5.698.767 expedidas a Wilson *et al.*

Inmunización de ratones Ig humanos

Cuando se usan ratones Ig humanos para criar anticuerpos humanos, tales ratones pueden ser inmunizados con una línea celular que expresa CD70, una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD70 y/o CD70 recombinante o una proteína de fusión de CD70, como se describe por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y Publicaciones PCT No. WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad después de la primera inmunización. Por ejemplo, una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) de antígeno CD70 pueden ser usados para inmunizar los ratones Ig humanos intraperitonealmente.

Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales plenamente humanos a CD70 son descritos en el Ejemplo 1 a continuación. La experiencia acumulativa con varios antígenos han mostrado que los ratones transgénicos responden cuando son inmunizados inicialmente intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por una inmunización IP y otra seguida a la semana hasta un total de seis) con antígeno en adyuvante de Freund incompleto. Sin embargo, adyuvantes diferentes a Freund también se encuentran efectivos. Además, células enteras en ausencia de adyuvante se encuentra que son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede ser monitoreada en el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas como por ejemplo, mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede ser secretado mediante ELISA y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-CD70 pueden ser usados para las fusiones (como se describe en el Ejemplo 1). Los ratones pueden ser reforzados intravenosamente con antígenos tres días antes del sacrificio y remoción del bazo. Se espera que pueda ser necesario efectuar 2-3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones son inmunizados comúnmente para cada antígeno. Usualmente, ambas cepas HCo7 y HCo12 son usadas. La generación de cepas de ratón HCo7 y HCo12 es descrita en la Patente Estadounidense No. 5.770.429 y el Ejemplo 2 de la Publicación PCT WO 01/09187, respectivamente. Además, ambos transgenes HCo7 y HCo12 pueden ser cruzados conjuntamente a un solo ratón que tiene dos transgenes de cadena pesada humanos diferentes (HCo7/HCo12). Alternativa o adicionalmente, la cepa de ratón KM Mouse® puede ser usada como se describe en la Publicación de PCT WO 02/43478.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos, esplenocitos y/o células de nodo linfático de ratones inmunizados pueden ser aislados y fusionados a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea de célula de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser seleccionados en cuanto a la producción de anticuerpos antígeno-específicos. Por ejemplo, suspensiones unicelulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden ser fusionadas a un sexto del número de células de mieloma de ratón sin segregación P3X63-Arg8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG. Alternativamente, las secreciones de una sola célula de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden ser fusionadas utilizando un método de electrofusión a base de campo eléctrico, utilizando un electroporador de fusión de célula de cámara grande (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Las células son depositadas a aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtítulo de fondo plano, seguidos por una incubación de una semana en medio alto contenido de glucosa DMEM con L-glutamina y piruvato de sodio (Mediatech, Inc., Rendón, VA) y contiene además Suero Bovino fetal de 20 % (Hyclone, Logan, UT), medio condicional P388DI al 18 %, factor de clonación de hibridoma origen al 5 % (BioVeris, Gaithersburg, VA), L-glutamina 4 mM, HEPES 5 mM, β-mercaptoetanol a 0,055 mM, penicilina 50 unidades/ml, estreptomycin 50 mg/ml y medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) 1X (Sigma; el HAT es agregado 24 horas después de la fusión). Después de una semana, las células cultivadas en un medio en el cual HAT fue reemplazado con HT. Luego las cavidades individuales pueden ser seleccionadas mediante ELISA en cuanto a IgM y de anticuerpos IgG. El crecimiento del hibridoma puede ser observado usualmente luego de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden ser redepositadas, seleccionados otra vez si es que todavía son positivos en cuanto a IgG humano, los anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados por lo menos dos veces mediante dilución limitante. Luego los subclones estables pueden ser cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de este anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, hibridomas seleccionados pueden ser cultivados en matraces spinner de dos litros para la purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden ser filtrados y concentrados antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). El IgG eluido puede ser verificado mediante electroforesis de gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución reguladora de pH que puede ser intercambiada a PBS y la concentración puede ser determinada mediante OD280 utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden ser metidos en alícuotas y almacenados a -80 °C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos pueden ser producidos en un transfectoma de célula huésped utilizando por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección genética como es bien conocido en el arte (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 2229: 1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos, ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o plena longitud pueden ser obtenidos mediante técnica de biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación de PCR o clonación ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden ser insertados a vectores de expresión de tal manera que los genes son enlazados operativamente a las secuencias de control de transcripción y traducción. En este contexto, el término "enlazado operativamente" se propone dar a entender que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de tal manera que las secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector sirven para su función propuesta de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencia de control de expresión son incluidos para ser compatibles por la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden ser insertados a un vector separado o más comúnmente, ambos genes son insertados al mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos que son insertados al vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector o ligación extremo embotado si ningún sitio de restricción está presente). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente pueden ser usados para crear genes de anticuerpos de plena longitud de cualquier isotipo de anticuerpo al insertarlos a los vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del isotipo adecuado, de tal manera que el segmento V_H es enlazado operativamente al (los) segmento(s) C_H dentro del vector y el uso de V_K es enlazado operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede ser clonado al vector, de tal manera que el péptido de señal es enlazado en cuadro al término amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína de señal sin inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" se propone incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadenas de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. *Methods in Enzymology* 185, Academia Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por aquellos experimentados en el arte que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a ser transformada, el nivel de expresión de proteínas deseado, etc. Secuencias reguladoras preferidas para expresión de células huésped en mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células mamíferas, tales como promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus Simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP) y polioma). Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β -globina. Todavía además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor prematuro de DV40 y la repetición Terminal larga de virus de leucemia de células T humano tipo 1 (Takebe, Y., *et al.*(1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpos y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes e replicación) y genes de marcador seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped a las cuales el vector ha sido introducido (véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas expedidas a Axel *et al.*). Por ejemplo, comúnmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped a la cual el vector ha sido introducido. Genes marcadores seleccionados preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el (los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras en (los) transfectado(s) a una célula huésped mediante técnica estándar. Se propone que las varias formas del término "transfección" abarque una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno a una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y los semejantes. Aunque es teóricamente posible expresar anticuerpos ya sea en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas y más preferiblemente células huésped mamíferas, es el más preferido debido a que tales células eucarióticas y en particular células mamíferas, son más probables que las células procarióticas para ensamblar y segregar un anticuerpo plegado adecuadamente e inmunológicamente activo. Se ha reportado que la expresión

procariótica de genes de anticuerpo no es efectiva para la producción de alto rendimiento de anticuerpo activo (Boss, M.A. y Word, C.R. (1985) *Immunology Today* 6: 12-13).

Las células huésped mamíferas preferidas para la expresión de anticuerpos recombinantes incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (en las que se incluyen células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77: 4216-4220, usada con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 620-621), células de mieloma de NSO, células de COS y células SP2. En particular, para uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión genética GS divulgado en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando vectores de expresión recombinante que codifican para genes de anticuerpos son introducidos a las células huésped mamíferas, los anticuerpos son producidos al cultivar las células huésped por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o más preferiblemente, secreción del anticuerpo al medio de cultivo al cual las células huésped son cultivadas. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteína estándar.

Caracterización de enlace de anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos pueden ser probados en cuanto a enlace a CD70 mediante por ejemplo, citometría de flujo. Brevemente, células que expresan CD70 son colectadas recientemente de matraces de cultivos de tejido y se prepara una solución de una sola célula. Las suspensiones de células que expresan CD70 son ya sea teñidas con un anticuerpo primario directamente o después de fijación con paraformaldehído al 1 % en PBS. Aproximadamente un millón de células son suspendidas en PBS que contiene BSA al 0,5 % y 50-200 µg/ml de anticuerpos primarios e incubadas sobre hielo durante 30 minutos. Las células son lavadas dos veces con PBS que contiene BSA al 0,1 %, NaN₃ al 0,01 %, resuspendidas en 100 µl de IgG de cabra-humano FITC-conjugado 1:100 diluido (Jackson ImmunoResearch, West Grive, PA) e incubadas sobre hielo por 30 minutos adicionales. Las células son lavadas otra vez dos veces, resuspendidas en 0,5 ml de solución reguladora del pH de lavado y analizadas en cuanto a teñido fluorescente sobre un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, CA).

Alternativamente, los anticuerpos pueden ser probados en cuanto a enlace a CD70 mediante ELISA estándar. Brevemente, cajas de microtítulo son recubiertas con CD70 purificado a 0,25 µg/ml en PBS y luego bloqueadas con albúmina de suero bovino al 5 % en PBS. Diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones CD-70-inmunizados) son agregadas a cada cavidad e incubadas durante 1-2 horas a 37 °C. Las cajas son lavadas con PBS/Tween y luego incubadas con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal Fc-específico de IgG de cabra-antihumano) conjugado a fosfatasa alcalina durante una hora a 37 °C. Después del lavado, las placas son divulgadas con sustrato de pNPP (1 mg/ml) y analizadas a OD de 405-650. Preferiblemente, los ratones que desarrollan los títulos más altos, serán usados para las fusiones.

Un análisis de ELISA como se describe anteriormente puede también ser usado para seleccionar hibridomas que muestran reactividad positiva con inmunógeno de CD70. Los hibridomas que se enlazan con alta avidéz a CD70 son subclonados y caracterizados adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células padre (mediante ELISA), puede ser escogido para elaborar un banco de células de 5-10 frascos almacenado a -140 °C y para la purificación de anticuerpo.

Para purificar anticuerpos anti-CD70, los sobrenadantes pueden ser utilizados y concentrados antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Farmacia, Piscataway, NJ). El IgG eluido puede ser purificado mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución reguladora del pH puede ser intercambiada a PBS y la concentración puede ser determinada mediante OD₂₈₀ utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden ser sometidos a alícuotas y almacenados a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CD70 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado utilizando reactivos disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL). Estudios de competencia utilizando anticuerpos monoclonales sin marcar y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden ser efectuados utilizando placas de ELISA recubiertas con CD70 como se describe anteriormente. El enlace del mAb biotinilado puede ser detectado con una sonda de fosfatasa alcalina estreptavidina. Alternativamente, se pueden efectuar estudios de competencia utilizando anticuerpos radiomarcados y anticuerpos competentes sin marcar que pueden ser detectados en un análisis Scatchard, como se describe adicionalmente en los Ejemplos posteriormente en la presente.

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se puede efectuar ELISA de isotipo utilizando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, cavidades de placa de microtítulo pueden ser recubiertas con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante toda la noche a 4 °C. Después del bloqueo con NSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipos purificados a temperatura ambiente por una a dos horas. Luego las cavidades se ponen a hacer reaccionar ya sea con IgG humano o sondas de

conjugado de fosfatasa alcalina IgM-específicas humanas. Las placas son divulgadas y analizadas como se describe anteriormente.

Los IgG humanos anti-CD70 pueden ser probados adicionalmente en cuanto a reactividad de antígeno CD70 mediante Transferencia de Western. Brevemente, CD70 puede ser preparado y sometido a electroforesis de gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados son transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con suero de becerro fetal al 10 % y probados con anticuerpos monoclonales a ser probados. El enlace de IgG humano puede ser detectado utilizando fosfatasa alcalina de IgG anti-humana y preparados con tabletas de sustrato de BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., San Luis, Mo).

Inmunconjugados

También se desvela en el presente documento un anticuerpo anti-CD70 o fragmento del mismo, conjugado a una porción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados son denominados en la presente como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas son denominados como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (esto es, extermina). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracita diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente, daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la divulgación incluyen duocarmicinas, maitansinas y auristatinas y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina están disponibles comercialmente (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos utilizando tecnología de enlazador disponible en el arte. Ejemplos de tipos de enlazador que han sido usados para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no están limitados a hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Un enlazador puede ser escogido si es, por ejemplo, susceptible a escisión mediante proteasas, tales como proteasas expresadas preferencialmente en tejido de tumor tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para una discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**: 199-215; Trail, P.A. *et al.* (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. y Kreitman, R.J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**: 1089-91; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**: 247-264.

Los anticuerpos pueden también conjugarse con un isótopo radioactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados como radioinmunconjugados. Ejemplos de isótopos radioactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstica o terapéuticamente incluye pero no está limitado a, yodo¹³¹, yodo¹²⁵, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio. Métodos para la preparación de radioinmunconjugados están establecidos en el arte. Ejemplos de radioinmunconjugados están disponibles comercialmente, en las que se incluyen, ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals) y BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals) y métodos similares pueden ser usados para preparar radioinmunconjugados utilizando los anticuerpos de la divulgación.

Los conjugados de anticuerpos pueden ser usados para modificar una respuesta biológica dada y la porción de fármaco no será implementada como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tal como amina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis de tumor o interferón- γ o modificadores de respuesta biológica tales como por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonia de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Técnicas para conjugar tal porción terapéutica a anticuerpos son bien conocidas, véase por ejemplo, Amon *et al.* "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.* "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2^a edición), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe,

“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Balswin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Rhorpe *et al.* “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Composiciones farmacéuticas

También se desvela en el presente documento una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales o porción(es) de enlace de antígeno de los mismos, de la invención, formulada conjuntamente con un portador aceptable farmacéuticamente. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos o inmunocombinados de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunocombinados) que tienen actividades complementarias.

Composiciones farmacéuticas también pueden ser administradas en terapia de combinación, esto es, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-CD70 de la invención combinado con por lo menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden ser usados en terapia de combinación como se describe en mayor detalle posteriormente en la presente en la sección de usos de los anticuerpos de la divulgación.

Como se usa en la presente, “portador aceptable farmacéuticamente” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retardan la absorción y los semejantes que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es apropiado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, esto es, anticuerpo o inmunocombinado, puede ser recubierto en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden desactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos pueden incluir una o más sales aceptables farmacéuticamente. Una “sal aceptable farmacéuticamente” se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico indeseable (véase por ejemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y los semejantes, también como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, ácidos alcanoico fenil-sustituídos, ácidos hidroxil alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y los semejantes. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y los semejantes, también como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y los semejantes.

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

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos apropiados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y los semejantes) y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden también contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos puede ser asegurada tanto mediante procedimientos de esterilización, supra y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y los semejantes. Puede también ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y los semejantes las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser efectuada por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores aceptables farmacéuticamente incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. El uso de tales medios y agentes por sustancias farmacéuticamente activas es conocido en el arte. Excepto ya que cualesquier medios o

agentes convencionales sea incompatible con el compuesto activo, el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la divulgación es contemplado. Compuestos activos complementarios pueden también ser incorporados a las composiciones.

5 Las composiciones terapéuticas deben comúnmente ser estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada apropiada a alta concentración del fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y los semejantes) y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede efectuarse al incluir en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

15 Soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por microfiltración esterilización. En general, las dispersiones son preparadas al incorporar el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualesquier ingredientes deseados adicionales de una solución filtrada estéril previamente de la misma.

25 La cantidad de activo ingrediente que puede ser combinado con un material portador para producir una forma de una sola dosificación variará dependiendo del sujeto que es tratado y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinado con un material portador para producir una forma de una sola dosificación será en general aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad fluctuará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un portador aceptable farmacéuticamente.

35 Los regímenes de dosificación son ajustados para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un solo bolo puede ser administrado, varias dosis divididas pueden ser administradas con el paso del tiempo o la dosis puede ser reducida o incrementada proporcionalmente como se indica por 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. La forma unitaria de dosificación como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la divulgación son determinadas por y directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser obtenido y (b) las limitaciones inherentes en el arte de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

45 Para la administración del anticuerpo, la dosificación fluctúa de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más usualmente 0,01 a 25 mg/kg del peso corporal del huésped. 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 en el intervalo de 1-10 mg/kg. Dosificaciones más altas, por ejemplo, 15 mg/kg de peso corporal, 20 mg/kg de peso corporal o 25 mg/kg de peso corporal pueden ser usadas como sea necesario. Un régimen de tratamiento ejemplar abarba 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. Regímenes de dosificación particulares para un anticuerpo anti-CD70 de la divulgación incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal vía administración intravenosa, el anticuerpo es dado utilizando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

60 En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales anti-CD70 con diferentes especificidades de enlace son administrados simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo es usualmente administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanal, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos pueden también ser irregulares como se indica al medir los niveles de sangre de anticuerpo al antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación es ajustada para obtener una concentración de anticuerpo en el plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida más larga, seguida por 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, una dosificación relativamente baja es administrada a intervalos relativamente infrecuentes en un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos es algunas veces requerida hasta que el avance de la enfermedad es reducido o terminado y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de esto, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas se pueden hacer variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para obtener la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica al paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos en los que se incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleadas o el éster, sal o amida del mismo, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que es empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con la composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que es tratado y factores semejantes bien conocidos en las artes médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-CD70 da como resultado preferiblemente una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de enfermedad o una prevención de deterioro o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores CD70+, una "dosificación terapéuticamente efectiva" inhibe preferiblemente el crecimiento celular o crecimiento de tumor por al menos aproximadamente 20 %, más preferiblemente por al menos aproximadamente 40 %, aún más preferiblemente por al menos aproximadamente 60 % y todavía más preferiblemente por al menos aproximadamente 80 % en relación con los sujetos sin tratar. La habilidad de un compuesto para inhibir el crecimiento del tumor puede ser evaluada en un sistema de modelo de animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada al examinar la habilidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro* mediante análisis conocidos para el práctico experimentado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño de tumor o de otra manera mejorar los síntomas en un sujeto. Aquel de habilidad ordinaria en el arte sería apto de determinar tales cantidades basándose en factores tales como la talla del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

Una composición puede ser administrada vía una o más rutas de administración utilizando uno o más de varios métodos conocidos en el arte. Como se apreciará por el técnico experimentado, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Rutas de administración preferidas para anticuerpos de la divulgación incluyen rutas de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas de administración parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en la presente significa modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e inyección intrasternal e infusión.

Alternativamente, un anticuerpo puede ser administrado vía una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópicamente.

Los compuestos activos pueden ser preparados con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, en los que se incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Polímeros biodegradables, biocompatibles pueden ser usados, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son en general conocidos para aquellos experimentados en el arte. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden ser administradas con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la divulgación puede ser administrada con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tales como los dispositivos divulgados en las patentes estadounidenses 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 y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: patente estadounidense 4.487.603, que divulga una bomba de micro-infusión implantable para surtir medicación a una velocidad controlada; patente estadounidense No. 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administración medicamentos a través de

la piel; patente estadounidense No. 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; patente estadounidense No. 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; patente estadounidense No. 4.439.196, que divulga un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimientos de multicámaras y patente estadounidense No. 4.475.196, que divulga un sistema de administración de fármaco osmótico. Muchos de otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos para aquellos experimentados en el arte.

Pueden formularse anticuerpos monoclonales humanos pueden ser formulados para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos, para asegurar que los compuestos terapéuticos crucen la BBB (si se desea), pueden ser formulados, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de manufactura de liposomas, véase, por ejemplo, Patentes estadounidenses 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que son transportadas selectivamente a células o órganos específicos, así mejoran la administración del fármaco apuntado (véase, por ejemplo, Y. V. Ranade (1989) *J Clin. Pharmacol.* 29:685). Porciones de apuntamiento ejemplares incluyen foliato o biotina (véase, por ejemplo, patente estadounidense 5.416.016 expedida a Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); un receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994; *Immunomethods* 4:273.

Usos y métodos de la divulgación

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpo y métodos desvelados en el presente documento tienen numerosas utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que involucran la diagnosis y tratamiento de alteraciones moderadas por CD70. Por ejemplo, estas moléculas pueden ser administrada a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo* o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y para diagnosticar varias alteraciones. Como se usa en la presente, el término se propone que el término "sujeto" incluya animales humanos y no humanos. El término "animales no humanos" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen alteraciones moderadas por la actividad de CD70. Los métodos son particularmente apropiados para tratar pacientes humanos que tienen una alteración asociada con la expresión de CD70 aberrante. Cuando los anticuerpos a CD70 son administrados junto con otro agente, los dos pueden ser administrados ya sea en un orden u otro o simultáneamente.

Dado el enlace específico de los anticuerpos de la invención para CD70, los anticuerpos pueden ser usados para detectar específicamente la expresión de CD70 sobre la superficie de células y además, pueden ser usados para purificar CD70 vía purificación de inmuoafinidad.

CD70 es expresado en varios cánceres humanos, en los que incluyen carcinomas de células renal, cáncer de pecho metastásico, tumores de cerebro, leucemias, linfomas y carcinomas nasofaríngeos (Junker *et al.* (2005) *J Urol.* 173:2150-3; Sloan *et al.* (2004) *Am J Pathol.* 164:315-23; Held-Feindt y Mentlein (2002) *Int J Cancer* 98:352-6; Hishima *et al.* (2000) *Am J Surg Pathol.* 24:742-6; Lens *et al.* (1999) *Br J Haematol.* 106:491-503). Un anticuerpo anti-CD70 puede ser usado solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Alternativamente, un anticuerpo anti-CD70 puede ser usado en conjunción con otros agentes inmunogénicos, tratamiento de cáncer estándar u otros anticuerpos, como se describe posteriormente en la presente.

Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede ser inhibido utilizando los anticuerpos de la invención incluyen cánceres comúnmente sensibles a inmunoterapia. Ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para tratamiento incluyen cáncer renal {por ejemplo, carcinoma de célula renal}, cáncer de pecho, tumores de cerebro, leucemias crónicas o agudas en las que se incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas {por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin, linfoma linfocítica, linfoma de CNS primario, linfoma de linfocitos T} y carcinomas nasofaríngeos. Ejemplos de otros cánceres que pueden ser tratados utilizando los métodos de la divulgación incluyen melanoma {por ejemplo, melanoma maligno metastásico}, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pecho, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, tumores de sólidos de la niñez, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uretra, carcinoma del pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (CNS), angiogénesis de tumor, tumor de eje espinal, glioma de tallo del cerebro, adenoma pituitario, Sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de célula escamosa, cánceres inducidos ambientalmente en los que se incluyen aquellos inducidos por asbestos, por ejemplo, mesotelioma y combinaciones de dichos cánceres.

Además, dada la expresión de CD70 sobre varias células de tumor, los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpo y métodos de la invención pueden ser usados para tratar un sujeto con una alteración tumorigénica, por ejemplo, una alteración caracterizado por la presencia de células de tumor que expresan CD70 en las que se incluye, por ejemplo, carcinomas de células renal (RCC), tales como RCC de célula clara, glioblastoma, cáncer de pecho, tumores de cerebro, carcinomas nasofaríngeos, linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas de célula grande anaplásicos (ALCL), mieloma múltiple, linfoma de linfocitos T cutáneos, linfomas de célula escindida pequeña nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de linfocitos T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia de linfocitos T/linfomas (ATLL), leucemia de linfocitos T adulta (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblasticos/centrocíclicos (cb/cc), linfomas de célula grande difusos de linaje B, linfoma de linfocitos T semejante a linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en cavidad de cuerpo asociadas de VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas sin diferenciar de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y otros linfomas de linfocitos B.

Así, se desvela en el presente documento un método para inhibir el crecimiento de células de tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD70 o parte de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD70 humano (tales como cualquiera de los anticuerpos CD70 anti-humanos humanos de la invención).

También se desvela en el presente documento el uso de anticuerpos para detectar niveles de CD70 o niveles de células que contienen CD70 sobre su superficie de membrana, tales niveles pueden ser enlazados a ciertos síntomas de enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser usados para inhibir o bloquear la función de CD70 que, a su vez, puede ser enlazada a la prevención o mejora de ciertos síntomas de enfermedad, implicando mediante esto a CD70 como mediador de la enfermedad. Esto se puede obtener al poner en contacto una muestra experimental y una muestra de control con el anticuerpo anti-CD70 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD70. Cualesquier complejos formados entre el anticuerpo y CD70 son detectados y comparados en la muestra experimental y el control.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden ser probados inicialmente en cuanto a actividad de enlace asociadas con el uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones pueden ser probadas utilizando los análisis citométricos de flujo descritos en los ejemplos posteriormente en la presente.

Los anticuerpos, inmunoconjugados y composiciones de la invención tienen utilidad adicional en terapia y diagnosis de enfermedades relacionadas con CD70. Por ejemplo, pueden ser usados para producir *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento de y/o exterminar una célula que expresa CD70; moderar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CD70 en presencia de células efectoras humanas; o bloquear el enlace de ligando de CD70 a CD70.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar varias enfermedades CD70-relacionadas. Ejemplos de enfermedades CD70-relacionadas incluyen cáncer, carcinomas de células renal (RCC), tales como RCC de célula clara, glioblastoma, cáncer de pecho, tumores de cerebro, carcinomas nasofaríngeos, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas de célula grande anaplásicos (ALCL), mieloma múltiple, linfomas de linfocitos T cutáneos, linfomas de célula escindida pequeña nodular, linfomas linfocíticos, linfomas de linfocitos T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia de linfocitos T/linfomas (ATLL), leucemia de linfocitos T adulta (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblasticos/centrocíclicos (cb/cc), linfomas de célula grande difusos de linaje B, linfoma de linfocitos T semejante a linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en cavidad asociada a VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas sin diferenciar de la rino-faringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y otros linfomas de linfocitos B.

Rutas de administración apropiadas de composiciones de anticuerpo *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en el arte y pueden ser seleccionadas por aquellos de habilidad ordinaria. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo pueden ser administradas mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones apropiadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se describe previamente, los anticuerpos anti-CD70 humanos pueden ser coadministrados con uno u otros más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede ser enlazado al agente (como un inmunocomplejo) o puede ser administrado separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede ser administrado antes, después o concurrentemente con el agente o puede ser co-administrado con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cáncer, por ejemplo radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), sulfato de cisplatina bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida hidroxurea que por sí mismos, son solamente efectivo a niveles que son tóxico o subtóxicos a un paciente. La cisplatina es administrada intravenosamente como una dosis de 100 mg una vez cada cuatro semanas y adriamicina

es administrada intravenosamente como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de anticuerpos anti-CD70 humanos o fragmentos de enlace de antígeno del mismo, con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticáncer que operan vía mecanismos diferentes que producen un efecto citotóxico a las células de tumor humanas. Tal co-administración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en el antigenicidad de las células de tumor que las volvería no reactivas con el anticuerpo.

Células efectoras específicas del objetivo, por ejemplo, células efectoras enlazadas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y bisespecíficas) pueden también ser usadas como agentes terapéuticos. Las células efectoras para apuntamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células exterminadoras naturales y otras células que llevan IgG- o IgA-. Si se desea, las células efectoras pueden ser obtenidas del sujeto a ser tratado. Las células efectoras específicas del objetivo pueden ser administradas como una suspensión de células en una solución aceptable fisiológicamente. El número de células administradas puede ser del orden de 10^8 - 10^9 pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en las células objetivo, por ejemplo, una célula de tumor que expresa CD70 y para efectuar el exterminio celular mediante por ejemplo fagocitosis. Las rutas de administración pueden también variar.

La terapia con células efectoras específicas del objetivo pueden ser efectuadas en conjunción con otras técnicas para la remoción de células apuntadas. Por ejemplo, terapia anti-tumor utilizando composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y bisespecíficas) y/o células efectoras armadas con estas composiciones pueden ser usadas en conjunción con quimioterapia. Adicionalmente, la inmunoterapia de combinación puede ser usada para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de célula de tumor. Por ejemplo, anticuerpos anti-CD70 enlazados a RI anti-Fc-gamma o anti-CD3 pueden ser usados en conjunción con agentes de enlace específicos de receptor de IgG o IgA.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos e inmunoconjugados) que tienen sitios de enlace de complemento, tales como porciones de IgG1, -2 o -3 o IgM que se unen al complemento, pueden también ser usados en presencia de complemento. El tratamiento ex vivo de una población de células que comprende células objetivo con un agente de enlace como se desvela en el presente documento y células efectoras apropiadas pueden ser complementados mediante la adición de complemento o complemento que contiene suero. La fagocitosis de células objetivo recubiertas con un agente de enlace de la divulgación puede ser mejorada mediante el enlace de proteínas de complemento. Células objetivo recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos) pueden también ser sometidas a lisis por el complemento. Como alternativa, pueden no activar el complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos e inmunoconjugados) pueden también ser administradas junto con el complemento. Así, las composiciones pueden comprender anticuerpos humanos y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas en que el complemento está localizado en proximidad estrecha a los anticuerpos humanos. Alternativamente, los anticuerpos humanos y el complemento o suero pueden ser administrados separadamente.

También se desvelan en el presente documento equipos que comprenden las composiciones de anticuerpo de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos o inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El equipo puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un radiotóxico o uno o más anticuerpos humanos adicionales (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno de CD70 distinto del primer anticuerpo humano).

Así, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden ser administrados adicionalmente (antes de, simultáneamente con o enseguida de la administración de un anticuerpo humano de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otras modalidades, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe, la expresión o actividad de receptores Fc γ o Fc γ , mediante por ejemplo, tratamiento del sujeto con una citocina. Citocinas preferidas para administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulador de colonias de granulocito (G-CSF), factor estimulador de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis de tumor (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos) de la invención pueden también ser usados para dirigir células que expresan Fc γ R o CD70, por ejemplo para la marcación de tales células. Para al uso, el agente de enlace puede ser enlazado a una molécula que puede ser detectada. Así, también se desvelan en el presente documento métodos para la localización ex vivo o *in vitro* de células que expresan receptores de Fc, tales como Fc γ R o CD70. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor de enzima.

También se desvelan en el presente documento métodos para detectar la presencia de antígeno de CD70 en una muestra o medir la cantidad de antígeno de CD70, que comprende poner en contacto la muestra y una muestra de

control, con un anticuerpo monoclonal humano o una parte de unión a antígeno del mismo, que se enlazan específicamente a CD70, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y CD70. La formación de un complejo es luego detectada, en el que una diferencia de formación de complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicadora de la presencia de antígeno de CD70 en la muestra.

También se desvela en el presente documento el uso inmunoconjugados para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular de CD70 al enlazarse el compuesto al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede ser conjugado a cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las patentes estadounidenses Nos. 6.281.354 y 6.548.530, publicación de patente estadounidense Nos. 20030050331, 20030064984, 20030073852 y 20040087497 o publicados en WO 03/022806. Así, la divulgación también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan CD70 (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor de enzima). Alternativamente, los inmunoconjugados pueden ser usados para exterminar células que tienen receptores de superficie celular de CD70 al dirigir citotoxinas o radiotoxinas a CD70.

La presente divulgación es ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitantes adicionales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra CD70

Antígeno

Protocolos de inmunización utilizados como CD70 humano recombinante de antígeno fusionado con una etiqueta myc-His doble. Alternativamente, la inmunización de célula entera utilizando la línea de célula de carcinoma renal 786-O (No. de Acceso ATCC CRL-1932) y reforzadas con la línea de célula de carcinoma renal A-498 (No. de Acceso ATCC HTB-44) fue usada en algunas inmunizaciones.

Ratón HuMAb[®] y Ratón KM[®] transgénicos

Anticuerpos monoclonales plenamente humanos a CD70 fueron preparados utilizando las cepas HCo7, HCo12 y HCo17 de ratones transgénicos HuMAb y la cepa KM de ratones trans cromosómicos transgénicos, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpo humanos. En estas cepas de ratón, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno ha sido sometido a disrupción homocigóticamente como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno ha sido sometido a disrupción homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación de PCT WO 01/09187. Además, esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humano, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 y un transgén de cadena pesada humano, HCo7, HCo 12 o HCo 17 como se describe en el Ejemplo 2 de publicación de PCT WO 01/09187. La cepa de ratón KM[®] contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la publicación de PCT WO 02/43478.

Inmunizaciones de HuMAb y KM:

Para generar anticuerpos monoclonales plenamente humanos a CD70, ratones de ratón HuMAb[®] y ratón KM[®] fueron inmunizado con CD70 humano recombinante como antígeno o células enteras que expresan CD70 sobre la superficie celular. Esquemas de inmunización generales para ratones HuMAb son descritos en Lonberg, N. *et al.* (1994; Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y publicación de PCT WO 98/24884. Los ratones fueron de 6-16 semanas de edad después de la primera infusión de antígeno. Se usaron 5-10 x 10⁶ células para inmunizar los ratones HuMAb intraperitonealmente (IP), subcutáneamente (Sc) o vía inyección del cuarto trasero.

Los ratones transgénicos fueron inmunizado dos veces con antígeno en adyuvante de Freund completo o IP adyuvante de Ribí, seguido por 3-21 días IP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante de Freund incompleto o Ribí. La respuesta inmune fue monitoreada mediante sangrías retroorbitales. El plasma fue seleccionado mediante ELISA y FACS (como se describe posteriormente en la presente) y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana de anti-CD70 fueron usados para las fusiones. Los ratones fueron reforzados intravenosamente con antígeno 3 días antes del sacrificio y remoción del bazo. Comúnmente, se efectuaron 10-35 fusiones para cada antígeno. Varias docenas de ratones fueron inmunizados por cada antígeno.

Selección de un ratón HuMAb[®] o ratón KM[®] que produce anticuerpos anti-CD70:

Para seleccionar un ratón HuMAb[®] o ratón KM[®] que produce anticuerpos que se unen a CD70, suero de ratones inmunizados fueron seleccionados mediante citometría de flujo en cuanto a enlace a una línea celular que expresa

CD70 humano recombinante, pero no a una línea de célula de control que no expresa CD70. Además, los sueros fueron seleccionados mediante citometría de flujo en cuanto a enlace de 786-0 o A-498. Brevemente, el enlace de anticuerpos anti-CD70 fue determinado al incubar células CHO que expresan CD70, células 786-0 o células A498 con el anticuerpo anti-CD70 una dilución de 1:20. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo de FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los anticuerpos que se enlazaron a las células de CHO que expresan CD70 pero no las células de CHO parentales que no expresan CD70 fueron probada adicionalmente en cuanto a enlace a CD70 mediante ELISA, como se describe por Fishwild, D. *et al.* (1996). Brevemente, placas de microtítulo fueron recubiertas con proteína de fusión de CD70 recombinante purificada de células CHO transfectadas a 1-2 µg/ml en PBS, 100 µl/cavidades incubadas 4 °C durante toda la noche luego bloqueados con 200 µl/cavidad de suero de pollo al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). Diluciones de suero de ratones CD70-inmunizados fueron agregadas a cada cavidad e incubadas durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con PBS/Tween y luego incubadas con un anticuerpo policlonal IgG de cabra-anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas fueron divulgadas con sustrato de ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y analizadas mediante espectrofotómetro a OD 415-495. Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-CD70 fueron usados para las fusiones. Las fusiones fueron efectuadas como se describe posteriormente en la presente y los sobrenadantes de hibridoma fueron probados en cuanto a actividad de anti-CD70 mediante ELISA.

20 Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos a CD70:

Los esplenocitos de ratón, aislado de un ratón HuMAb[®] y/o un ratón KM[®], fueron fusionados a una línea de célula de mieloma de ratón utilizando ya sea PEG a base de protocolos estándar o electrofusión a base de campo eléctrico utilizando un electroporador de fusión de célula de cámara grande de Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Luego los hibridomas resultantes fueron seleccionados en cuanto a la producción de anticuerpos antígeno-específico. Suspensiones de una sola célula de esplenocitos de ratones inmunizados fueron fusionadas a un cuarto del número de células de mieloma de ratón que no segregan SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50 % (Sigma). Las células fueron depositadas a aproximadamente 1×10^5 /cavidad en una placa de microtítulo de fondo plano, seguido por incubación de una semana en un medio de glucosa de alto contenido de DMEM con L-glutamina y piruvato de sodio (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y que contiene además suero bovino fetal al 10 % (Hyclone, Logan, UT), medio condicional P388DI al 18 %, factor de clínico de hibridoma Origen al 5 % (BioVeris, Gaithersburg, VA), L-glutamina 4 mM, HEPES 5 mM, β-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y medio de hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT) 1X (Sigma; el HAT es agregado 24 horas después de la fusión). Después de una semana, las células cultivadas en el medio en el cual HAT fue usado fueron reemplazadas con HT. Luego las cavidades individuales fueron seleccionadas mediante FACS o ELISA (descritos anteriormente) en cuanto a anticuerpos IgG monoclonales anti-CD70 humanos. Una vez que se presentó el crecimiento de hibridoma extenso, el medio fue monitoreado usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo se volvieron a sembrar, se seleccionaron otra vez y si todavía son positivos para IgG humano, anticuerpos monoclonales anti-CD70 fueron subclonados por lo menos dos veces mediante dilución limitante. Luego los subclones estables fueron cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para su caracterización adicional.

Los clones de hibridoma 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7, fueron seleccionados para análisis adicional.

45 **Ejemplo 2: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales humanos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7**

Las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7 fueron obtenidas de los hibridomas de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7, respectivamente, utilizando técnicas de PCR estándar y fueron secuenciados utilizando técnicas de secuenciación de ADN estándar.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2H5 son mostrados en la figura 1A y en SEC ID N^o: 41 y 1, respectivamente.

55 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2H5 son mostradas en la figura 1B y en SEC ID N^o: 46 y 6, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 2H5 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocida demuestran que la cadena pesada de 2H5 utiliza un segmento de VH de la línea de germinación humana VH 3-30.3, un segmento D sin determinar y un segmento JH de la línea de germinación humana JH 4b. La alineación de la secuencia de VH de 2H5 con la secuencia de VH 3-30.3 de línea de germinación es mostrada en la figura 6. El análisis adicional de la secuencia de VH de 2H5 utilizando el sistema de Kabat de la región de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las figuras 1A y 6 y en SEC ID N^o: 11, 16 y 21, respectivamente.

- 5 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 2H5 con la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demuestran que la cadena ligera de 2H5 utiliza un segmento de VL de la línea de germinación humana VK L6 y un segmento de JK de la línea de germinación humana JK 4. La alineación de la secuencia de VL de 2H5 con la secuencia de VK L6 de línea de germinación es mostrada en la figura 9. El análisis adicional de la secuencia de VL de 2H5 utilizando el sistema de Kabat de la determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las figuras 1B y 9 y en SEC ID N°: 26, 31 y 36, respectivamente.
- 10 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 10B4 son mostradas en la figura 2A y en SEC ID N°: 42 y 2, respectivamente.
- 15 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 10B4 son mostrados en la figura 2B y en SEC ID N°: 47 y 7, respectivamente.
- 20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 10B4 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demuestra que la cadena pesada de 10B4 utiliza un segmento de VH de la línea de germinación humana VH 3-30.3, un segmento D de la línea de germinación humana 4-11 y un segmento de JH de la línea de germinación humana JH 4b. La alineación de la secuencia de VH de 10B4 con la secuencia de 3-30.3 de línea de germinación es mostrada en la figura 6. El análisis adicional de la secuencia de VH de 10B4 utilizando el sistema de Kabat de determinación de región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las figuras 2A y 6 y en SEC ID N°: 12, 17 y 22, respectivamente.
- 25 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 10B4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocida demuestran que la cadena ligera de 10B4 utiliza un segmento de VL de la línea de germinación humana VK L18 y un segmento de JK de la línea de germinación humana JK 3. La alineación de la secuencia de VL de 10B4 con la secuencia de VK L18 de línea de germinación es mostrada en la figura 10. El análisis adicional de la secuencia de VL de 10B4 utilizando el sistema de Kabat de la determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las figuras 2B y 10 y en SEC ID N°: 27, 32 y 37, respectivamente.
- 30 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 8B5 se muestran en la Figura 3A y en SEC ID N°: 43 y 3, respectivamente.
- 35 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 8B5 se muestran en la Figura 3B y en SEC ID N°: 48 y 8, respectivamente.
- 40 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 8B5 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demostró que la cadena pesada de 8B5 utiliza un segmento de VH de la línea de germinación VH-33, un segmento D de la línea de germinación humana 3-10 y un segmento JH de la línea de germinación humana JH 4b. La alineación de la secuencia VH de 8B5 con la secuencia de VH 3-33 de línea de germinación es mostrada en la figura 7. El análisis adicional de la secuencia de VH de 8B5 utilizando el sistema de Kabat de la determinación de región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las figuras 3 A y 7 y en SEC ID N°: 13, 18 y 23, respectivamente.
- 45 La comparación de secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 8B5 con la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demostró que la cadena ligera de 8B5 utiliza un segmento de VL de la línea de germinación humana VK L15 y un segmento JK de la línea de germinación humana JK 4. La alineación de la secuencia de VL de 8B5 con la secuencia de VK L15 de línea de germinación es mostrada en la figura 11. El análisis adicional de la secuencia de VL de 8B5 utilizando el sistema de Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las figuras 3B y 11 y en SEC ID N°: 28, 33 y 38, respectivamente.
- 50 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 18E7 son mostrados en la figura 4A y en SEC ID N°: 44 y 4, respectivamente.
- 55 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 18E7 son mostradas en la figura 4B y en SEC ID N°: 49 y 9, respectivamente.
- 60 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 18E7 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demostró que la cadena pesada de 18E7 utiliza un segmento de VH de la línea de germinación humana VH 3-33, un segmento D de la línea de germinación humana 3-10 y un segmento de JH de la línea de germinación humana JH 4b. La alineación de la secuencia de VH de 18E7 con la secuencia de VH 3-33 de línea de germinación es mostrada en la figura 7. El análisis adicional de la secuencia de VH de 18E7 utilizando el sistema de Kabat de determinación de región de CDR condujo a la
- 65

delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las figuras 4A y 7 y en SEC ID N°: 14, 19 y 24, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 18E7 con las secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demostró que la cadena ligera de 18E7 utiliza un segmento de VL de la línea de germinación humana VK L15 y un segmento JK de la línea de germinación humana JK 4. La alineación de la secuencia de VL de 18E7 con la secuencia de VK L15 de línea de germinación es mostrada en la figura 11. El análisis adicional de la secuencia de VL de 18E7 utilizando el sistema de Kabat de determinación de región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las figuras 4B y 11 y en SEC ID N°: 29, 34 y 39, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 69A7 son mostradas en la figura 5 A y en SEC ID N°: 45 y 5, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 69A7 son mostradas en la figura 5B y en SEC ID N°: 50 y 10, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 69A7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demostró que la cadena pesada de 69A7 utiliza un segmento de VH de la línea de germinación humana VH 4-61, un segmento D de la línea de germinación humana 4-23 y un segmento de JH de la línea de germinación humana JH 4b. La alineación de la secuencia de VH de 69A7 con la secuencia de VH 4-61 de línea de germinación es mostrada en la figura 8. El análisis adicional de la secuencia de VH de 69A7 utilizando el sistema de Kabat de determinación de región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las figuras 5A y 9 y en SEC ID N°: 15, 20 y 25, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 69A7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea de germinación humana conocidas demostró que la cadena ligera de 69A7 utiliza un segmento de VL de la línea de germinación humana VK L6 y un segmento de JK de la línea de germinación humana JK 4. La alineación de la secuencia de VL de 69A7 con la secuencia de VK L6 de línea de germinación es mostrada en la figura 12. El análisis adicional de la secuencia de VL de 69A7 utilizando el sistema de Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las figuras 5B y 12 y en SEC ID N°: 30, 35 y 40, respectivamente.

Ejemplo 3: Caracterización de especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70

Se llevó a cabo una comparación de anticuerpos anti-CD70 en la unión con CD70 inmunopurificado mediante ELISA estándar, para examinar la especificidad de enlace por CD70.

CD70 myc-marcado recombinante fue recubierto sobre una placa durante toda la noche, luego probado en cuanto a enlace contra los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7. Se efectuaron procedimientos de ELISA estándar. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 fueron agregados a una concentración de 1 µg/ml y titulados en diluciones seriales 1:2. El anticuerpo policlonal de IgG de cabra anti-humano (específico de cadena para Fc o kappa) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) fue usado como anticuerpo secundario. Los resultados son mostrados en la figura 13. Los anticuerpos menos humanos anti-CD70 2H5, 10B4, 8B5 y 18E7 se enlazaron con alta especificidad a CD70.

Ejemplo 4: Caracterización de enlace de anticuerpo anti-CD70 a CD70 expresado sobre la superficie de línea de célula de carcinoma de cáncer renal

Anticuerpos anti-CD70 fueron probados en cuanto a enlace a células de carcinoma de célula renal que expresan CD70 sobre su superficie celular mediante citometría de flujo.

Las líneas de célula de carcinoma de célula renal A-498 (No. de Acceso ATCC HTB-44), 786-0 (No. de Acceso ATCC CRL-1932), ACHN (No. de Acceso ATCC CRL-1611), Caki-1 (No. de Acceso ATCC HTB-46) y Caki-2 (No. de Acceso ATCC HTB-47) fueron cada una probadas en cuanto a enlace de anticuerpo. El enlace del HuMAb 2H5 anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 fue determinado al incubar 1×10^5 células con 2H5 a una concentración de 1 µg/ml. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. Análisis citométrico de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 14. El anticuerpo monoclonal anti-CD70 2H5 se enlazó a las líneas de célula de carcinoma renal A-498, 786-0, ACHN, Caki-1 y Caki-2.

Las líneas de célula de carcinoma de célula renal 786-O y A-498 fueron probadas en cuanto a enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 HuMAb 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 a diferentes concentraciones. El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 fue determinado al incubar 5×10^5 células con anticuerpo a una concentración de partida de 50 µg/ml y dilución en serie del anticuerpo a una dilución 1:3. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con Ab de IgG anti-humano PE-marcado. Análisis citométrico de

flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 15A (786-O) y figura 15B (A-498). Los anticuerpos monoclonales anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 se enlazaron a las líneas de célula de carcinoma renal 786-O y A-498 de manera dependiente de la concentración, tal como es medida mediante intensidad fluorescente media (MFI) del teñido. Los valores de EC₅₀ para los anticuerpos monoclonales anti-CD70 fluctuaron de 1,844 nM a 6,669 nM para la línea celular 786-O y 3,984 nM a 11,84 nM para la línea celular A-498.

El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 HuMAb 2H5 y 69A7 a la línea de célula de carcinoma de célula renal 786-O fue determinado al incubar 2×10^5 células ya sea con 2H5 o 69A7 a una concentración de 10 µg/ml. Un anticuerpo de control de isotipo fue usado como control negativo. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG de anti-humano FITC-marcado. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 15C. Ambos anticuerpos monoclonales anti-CD70 se enlazaron a la línea de célula de carcinoma renal 786-O.

La línea de célula de carcinoma de célula renal 786-O fue probada en cuanto a enlace del anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 HuMAb 69A7 a diferentes concentraciones. El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 fue determinado al incubar 5×10^5 células con anticuerpo a una concentración de partida de 10 µg/ml y dilución en serie del anticuerpo a una dilución de 1:3. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano PE-marcado. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 15D. El anticuerpo monoclonal anti-CD70 69A7 se enlazó a la línea de célula de carcinoma renal 786-O de manera dependiente de la concentración, tal como se mide por la intensidad de teñido fluorescente medio (MFI). El valor de EC₅₀ para el enlace del anticuerpo monoclonal anti-CD70 69A7 a células de 786-O fue de 6,927 nM.

Estos datos demuestran que los HuMAbs anti-CD70 se unen a la línea de célula de carcinoma de célula renal.

Ejemplo 5: Caracterización del enlace de anticuerpo anti-CD70 a CD70 expresado sobre la superficie de líneas de célula de linfoma

Anticuerpos anti-CD70 fueron probados en cuanto a enlace a células de linfoma que expresan CD70 sobre su superficie celular mediante citometría de flujo.

Las líneas de célula de linfoma Daudi (No. de Acceso ATCC CCL-213), HuT 78 (No. de Acceso ATCC TIB-161) y Raji (No. de Acceso ATCC CCL-86) fueron cada una probadas en cuanto a enlace del anticuerpo. El enlace del anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 HuMAb 2H5 fue determinado al incubar 1×10^5 células con 2H5 a una concentración de 1 µg/ml. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. La línea de célula de Jurkat, que no expresa CD70 sobre la superficie de la célula, fue usada como control negativo. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo de FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 16. El anticuerpo monoclonal anti-CD70 2H5 se enlazó a las líneas de célula de linfoma Daudi, HuT 78 y Raji, tal como se mide por la intensidad de teñido fluorescente media (MFI).

Las líneas de célula de linfoma Raji y Granta 519 (No. de Acceso DSMZ 342) fueron probadas en cuanto a enlace del anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 HuMAb 2H5 a concentraciones variables. El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 fue determinado al incubar 5×10^5 células con anticuerpo a una concentración de partida de 50 µg/ml y dilución en serie del anticuerpo a una dilución de 1:3. Un anticuerpo de control de isotipo fue usado como control negativo. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con Ab de IgG anti-humano PE-marcado. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo de FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en las figuras 17A (Raji) y 17B (Granta 519). El anticuerpo monoclonal anti-CD70 2H5 se enlazó a las líneas de células de linfoma Raji y Granta 519 de manera dependiente de la concentración, tal como se mide mediante la intensidad de teñido presente medio (MFI). Los valores de EC₅₀ para el anticuerpo anti-CD70 fueron 1,332 nM para las células de Raji y 1,330 nM para las células Granta 519.

El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD70 HuMAbs 2H5 y 69A7 a la línea de célula de linfoma de Raji fue determinado al incubar 2×10^5 células con HuMAb a una concentración de 10 µg/ml. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. Un anticuerpo de control de isotipo y anticuerpo secundario solo fueron usados como control negativo. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 17C. Ambos anticuerpos monoclonales anti-CD70 se enlazaron a la línea de célula de linfoma de Raji, tal como se mide por la intensidad fluorescente media (MFI) del teñido.

Un análisis de FACS de competencia efectuado para elucidar la especificidad de enlace de 69A7 contra 2H5. Células de Raji fueron incubadas con ya sea con 69A7 desnudo, 2H5, un anticuerpo de control de isotipo o ningún anticuerpo a una concentración de 10 µg/ml. Después del lavado, las células fueron incubadas con 69A7 FITC-conjugado a una concentración de 10 µg/ml. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG

anti-humano FITC-marcado. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 17D. Ambos del anticuerpo anti-CD70 69A7 y 2H5 bloquearon el enlace de 69A7 FITC-marcado, indicando que ambos 2H5 y 69A7 comparten un epítipo de enlace similar.

La línea de célula de linfoma de Daudi y célula de carcinoma renal 786-O fueron probadas adicionalmente en cuanto a enlace de anticuerpo. El enlace del anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 HuMAb 69A7 fue determinado al incubarse 2×10^5 células con 69A7 a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. La línea de célula de Jurkat, que no expresa CD70 sobre la superficie celular, fue usada como control negativo. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 17E. El anticuerpo monoclonal anti-CD70 69A7 se enlazó a la línea de célula de linfoma de Daudi y línea de célula de carcinoma renal 786-O, tal como se mide mediante la intensidad fluorescente media (MFI) del teñido.

Estos datos demuestran que los HuMAbs anti-CD70 se unen a líneas de célula de linfoma.

Ejemplo 6: Análisis de Scatchard de afinidad de enlace de anticuerpos monoclonales anti-CD70

La afinidad de enlace de los anticuerpos monoclonales 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 fue probado en cuanto a afinidad de enlace a una línea de célula de CHO CD70 transfectada utilizando un análisis de Scatchard.

Células CHO fueron transfectadas con CD70 de plena longitud utilizando técnicas estándar y cultivadas en un medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10 % (FBS). Las células fueron triptinizadas y lavadas una vez en solución reguladora del pH de enlace a base de Tris (24 mM Tris pH 7,2, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM Glucosa, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1 % BSA) y las células fueron ajustadas a 2×10^6 células/ml en solución reguladora del pH de enlace. Placas de Millipore (MAFB NOB) fueron recubiertas con leche anhidra sin grasas al 1 % en agua y almacenadas a 4°C durante toda la noche. Las placas fueron lavadas tres veces con 0,2 ml de solución reguladora del pH de enlace. Cincuenta microlitros de solución reguladora del pH sola fueron agregados a las cavidades de enlace máximo (enlace total). Veinticinco microlitros de solución reguladora sola fueron agregados a las cavidades de control (enlace no específico). Se agregó una concentración variable de anticuerpo ^{125}I -anti-CD70 a todas las cavidades en un volumen de 25 μl . Se agregaron concentraciones variables de anticuerpo sin marcar a un exceso de 100 veces en un volumen 25 μl a cavidades de control y 25 μl de células CHO CD70 transfectadas (2×10^6 células/ml) en solución reguladora del pH de enlace fueron agregados a todas las cavidades. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a 200 RPM en un agitador a 4°. En la consumación de la incubación, las placas Millipore fueron lavadas tres veces con 0,2 ml de solución reguladora del pH de lavado frío (24 mM Tris pH 7,2, 500 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM de glucosa, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1 % BSA). Los filtros fueron removidos y contados en un contador gamma. La evaluación de enlace de equilibrio fue efectuada utilizando parámetros de enlace de un solo sitio con los elementos de programación de Prism (San Diego, CA).

Utilizando el análisis de enlace de Scatchard anterior, la K_D del anticuerpo para células de CHO transfectadas con CD70 fue de aproximadamente 2,1 nM para 2H5, 5,1 nM para 8B5, 1,6 nM para 10B4 y 1,5 nM para 18E7.

Ejemplo 7: Internalización de anticuerpo monoclonal anti-CD70

Los HuMAbs anti-CD70 fueron probados por la habilidad para internalizarse a células de carcinoma renal que expresan CD70 utilizando un análisis de internalización de Hum-Zap. El análisis Hum-Zap prueba la internalización de un anticuerpo humano primario por medio del enlace de un anticuerpo secundario con afinidad por IgG humano conjugado a la toxina saporina.

La línea de célula de cáncer de carcinoma renal que expresa CD70 786-O fue sembrada a $1,25 \times 10^4$ células/cavidad en cavidades de 100 μl durante toda la noche. Los anticuerpos HuMAb anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 o 18E7 fueron agregados a las cavidades a una concentración de partida de 30 nM y titulados a diluciones seriales 1:3. Un anticuerpo de control de isotipo que es no específico para CD70 fue usado como control negativo. El Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25) fue agregado a una concentración de 11 nM y se permite que las placas se incuben durante 72 horas. Luego las placas fueron pulsadas con 1,0 μCi de ^3H -timidina durante 24 horas, cosechadas y leídas en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los resultados son mostrados en la figura 18. Los anticuerpos anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 mostraron una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo en la incorporación de ^3H -timidina en célula de cáncer de carcinoma renal 786-O que expresan CD70. El valor de EC_{50} para el anticuerpo anti-CD70 2H5 fue de 0,9424 nM. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 se internalizan a una línea de célula de cáncer de carcinoma renal.

Ejemplo 8: Determinación de exterminio celular de un anticuerpo anti-CD70 toxina-conjugado sobre líneas de célula de carcinoma de célula renal

En este ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD70 conjugados a una toxina fueron probados en cuanto a la

habilidad para exterminar líneas de célula de carcinoma de célula renal CD70+ en un análisis de proliferación celular.

Los anticuerpos HuMAb anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 o 18E7 fueron conjugados a una toxina vía un enlazador, tal como un enlazador de peptidilo, hidrazona o disulfuro. Las líneas de célula de cáncer de carcinoma renal que expresan CD70 ACHN y Caki-2 fueron sembradas a $2,5 \times 10^4$ células/cavidad y la línea de célula de cáncer de carcinoma renal que expresa CD70 786-O fue sembrada a $1,25 \times 10^4$ células/cavidad en cavidades de 100 μ l durante 3 horas. Un conjugado de anticuerpo anti-CD70-toxina fue agregado a las cavidades a una concentración de partida de 30 nM y titulado a diluciones seriales 1:3. Un anticuerpo de control de isotipo que es no específico para CD70 fue usado como control negativo. Se permite que las placas se incuben durante 69 horas. Luego las placas fueron pulsadas con 1,0 μ Ci de 3 H-timidina durante 24 horas, cosechadas y leídas en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los resultados son mostrados en las figuras 19A (Caki-2), 19B (786-O) y 19C (ACHN). Los anticuerpos anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 mostraron una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo-toxina en la incorporación de 3 H-timidina en células de cáncer de carcinoma renal Caki-2, 786-O y ACHN que expresan CD70. Los valores de EC₅₀ para los anticuerpos anti-CD70 fluctuaron de 6,728 nM a 76,05 nM en las células CAKI-2, 1,635 nM a 3,940 nM en las células 786-O y 9,406 nM a 108,5 nM en las células ACHN. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 2H5, 8B5, 10B4 y 18E7 son citotóxicos a las células de cáncer de carcinoma renal cuando son conjugados a una toxina.

Ejemplo 9: Determinación de la actividad de ADCC del anticuerpo anti-CD70

En este ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD70 fueron probados en cuanto a la habilidad para exterminar líneas de célula CD70+ en presencia de células efectoras vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en un análisis de citotoxicidad de fluorescencia.

Células efectoras humanas fueron preparadas a partir de sangre entera como sigue. Células mononucleares de sangre periférica humana fueron purificadas a partir de sangre entera heparinizada mediante separación de Ficoll-paque estándar. Las células fueron resuspendidas en un medio de RPMI 1640 que contiene FBS al 10 % y 200 U/ml de IL-2 humano e incubadas durante toda la noche a 37°C. El siguiente día, las células fueron recolectadas y lavadas cuatro veces en medio de cultivo y resuspendidas a 2×10^7 células/ml. Células CD70+ objetivo fueron incubadas con reactivo de BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 μ l de BATDA por 1×10^6 células objetivo/ml durante 20 minutos a 37°C. Las células objetivas fueron lavadas cuatro veces, centrifugadas y traídas a un volumen final de 1×10^5 células/ml.

Líneas de célula CD70+ ARH-77 (leucemia de linfoblasto humano B; No. de Acceso ATCC CRL-1621), HuT 78 (linfoma de linfocito cutáneo humano; No. de Acceso ATCC TIB-161), Raji (linfoma de Burkitt de linfocito humano B; No. de Acceso ATCC CCL-86) y una línea de célula de control negativo L540 (linfoma de Hodgkin humano; N. de Depósito DSMZ ACC 72) fueron probadas en cuanto a ADCC específico de anticuerpo a los anticuerpos monoclonales anti-CD70 utilizando el análisis de emisión de fluorescencia de Delfia como sigue. Cada línea de célula objetivo (100 μ l de células objetivo marcadas) fue incubada con 50 μ l de células efectoras y 50 μ l de anticuerpo. Se usó una proporción de objetivo a efector de 1:50 en todos los experimentos. En todos los estudios, un control de isotipo de IgG1 humano fue usado como control negativo. Enseguida, una centrifugación de impulso de 2000 rpm y una incubación de una hora a 37°C, los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados rápidamente otra vez y 20 μ l de sobrenadante fueron transferidos a una placa de fondo plano, a la cual se agregaron 180 μ l de solución de Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y leída en un lector RubyStar (BMG Labtech). El % de lisis fue calculado como sigue: (liberación de muestra - liberación espontánea * 100) / (liberación máxima - liberación espontánea), en el que la liberación espontánea es la fluorescencia de cavidades que solamente contienen células objetivo y liberación máxima es la fluorescencia de cavidades que contienen células objetivo y han sido tratadas con Triton-X a 2 %. El % de lisis de citotoxicidad de célula para las líneas de célula ARH-77, HuT 78, Raji y L-540 son mostrados en las figuras 20A-D, respectivamente. Cada una de las líneas celulares que expresan CD70+ ARH-77, HuT 78 y Raji mostraron citotoxicidad moderada por anticuerpo con los anticuerpos anti-CD70 HuMAb 2H5 y 18E7, en tanto que la línea de célula de control negativo L-540 no tiene citotoxicidad celular apreciable en presencia de anticuerpos anti-CD70. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 HuMAb muestran citotoxicidad específica a células que expresan CD70+.

Ejemplo 10: Determinación de exterminio celular de un anticuerpo anti-CD70 toxina-conjugado sobre líneas de célula de linfoma humana

En este ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD70 conjugados a una toxina fueron probados en cuanto a la habilidad para exterminar líneas de célula de linfoma humano CD70+ en un análisis de proliferación celular.

El anticuerpo HuMAb anti-CD70 2H5 fue conjugado a una toxina vía un enlazador, tal como un enlazador de peptidilo, hidrazona o disulfuro. Ejemplos de compuestos de toxina que pueden conjugarse con los anticuerpos de la presente divulgación son descritos en una solicitud presentada concurrentemente con el No. de expediente del abogado 04280/100M629US3, presentada el 26 de septiembre de 2005. Las líneas de células de cáncer de linfoma humano que expresan CD70 Daudi, HuT 78, Granta 519 y Raji fueron sembradas a 10^5 células/cavidad en cavidades de 100 μ l durante 3 horas. Un conjugado de anticuerpo anti-CD70-toxina fue agregado a las cavidades a

una concentración de partida de 30 nM y titulado a diluciones seriales 1:2. El conjugado de anticuerpo HuMAb 2H5-toxina fue también probado sobre células de Jurkat, una línea de célula de control negativo que no expresa CD70 sobre la superficie celular. Se permite que las placas se incuben durante 72 horas. Luego las placas fueron pulsadas con 0,5 μCi de ^3H -timidina durante 8 horas antes de la terminación del cultivo, cosechadas y leídas en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments). La figura 21 muestra los efectos del conjugado 2H5 sobre las células Daudi, HuT 78, Granta 519 y Jurkat. El anticuerpo anti-CD70 2H5 mostró una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo-toxina en la incorporación de ^3H -timidina en células de cáncer de linfoma de Daudi, HuT 78 y Granta 519 que expresan CD70 pero no en la célula de Jurkat.

En un análisis separado, la línea de célula de cáncer de linfoma humano que expresa CD70 Raji fue sembrada a 10^4 células/cavidad en cavidades de 100 μl durante 3 horas. Un conjugado de anticuerpo anti-CD70-toxina fue agregado a las cavidades a una concentración de partida de 30 nM y titulado a diluciones seriales de 1:3. Un anticuerpo de control de isotipo de toxina-conjugado fue usado como control. Se permite que las placas se incuben durante 72 horas ya con un lavado a 3 horas o un lavado continuo. Luego las placas fueron pulsadas con 0,5 μCi de ^3H -timidina durante 8 horas antes de la terminación del cultivo, cosechadas y leídas en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments). Las figuras 22A y 22B muestran una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo-toxina en la incorporación de ^3H -timidina sobre células de Raji con un lavado de 3 hora o con un lavado continuo, respectivamente.

Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 conjugados a toxina muestran citotoxicidad específica a células de cáncer de linfoma humano.

Ejemplo 11: Tratamiento de modelo de xenoinjerto de tumor *in vivo* utilizando anticuerpos anti-CD70 desnudos y citotoxina-conjugados

Ratones implantados con un tumor de carcinoma de célula renal fueron tratados *in vivo* con anticuerpos anti-CD70 toxina-conjugados para examinar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento del tumor.

Células A-498 (No. de Acceso ATCC HTB-44) y ACHN (No. de Acceso ATCC CRL-1611) fueron expandidas *in vitro* utilizando procedimientos de laboratorio estándar. Ratones desnudos atímicos Ncr machos (Taconic, Hudson, NY) de entre 6-8 semanas de edad fueron implantados subcutáneamente en el flanco derecho con $7,5 \times 10^6$ células ACHN o A-498 en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Los ratones fueron pesados y medidos en cuanto a tumores tridimensionalmente utilizando un calibrador electrónico dos veces a la semana después del implante. Los volúmenes del tumor fueron calculados como altura x ancho x longitud. Los ratones con tumores ACHN promediaron 270 mm^3 o tumores de A498 que promedian 110 mm^3 fueron aleatorizados en grupos de tratamiento. Los ratones fueron dosificados intraperitonealmente con vehículo PBS, anticuerpo de control de isotipo toxina-conjugado o HuMAb anti-CD70 toxina-conjugado 2H5 en el día 0. Ejemplos de compuestos de toxina que pueden conjugarse con los anticuerpos de la presente divulgación son descritos en la solicitud presentada concurrentemente con el número de referencia MEDX-0034US4. Los ratones en el grupo de muestra A-498 fueron probados con tres compuestos de toxina diferentes. Los ratones fueron monitoreados en cuanto a crecimiento del tumor durante 60 días post-dosificación. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando los tumores llegaron al punto final del tumor (2000 mm^3). Los resultados son mostrados en la figura 23A (tumores A-498) y 23B (tumores ACHN). El anticuerpo anti-CD70 2H5 conjugado a una toxina prolongó el tiempo promedio para llegar al volumen del punto final del tumor (2000 mm^3) y frenó el avance de crecimiento del tumor. Así, el tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD70-toxina tiene un efecto inhibitor *in vivo* directo sobre el crecimiento del tumor.

Ejemplo 12: Inmunohistoquímica con 2H5

La habilidad del HuMAb anti-CD70 2H5 para reconocer CD70 mediante inmunohistoquímica fue examinada utilizando biopsias clínicas de pacientes con carcinoma de célula renal de célula clara (ccRCC), linfoma y pacientes de glioblastoma.

Para la inmunohistoquímica, se usaron secciones congeladas de 5 μm (Ardais Inc, Estados Unidos). Después del secado durante 30 minutos, las secciones fueron fijadas con acetona (a una temperatura ambiente durante 10 minutos) y secados por aire durante 5 minutos. Luego los portaobjetos fueron enjuagados en PBS y luego pre-incubados con suero de cabra normal al 10 % en PBS durante 20 minutos e incubados subsecuentemente con 10 $\mu\text{g/ml}$ de 2H5 fitilado en PBS con suero de cabra normal al 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS e incubados durante 30 minutos con anti-FITC de ratón (10 $\mu\text{g/ml}$ de DAKO) a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados otra vez con PBS e incubados con conjugado de anti-ratón de cabra HRP (DAKO) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados otra vez 3 veces con PBS. Se usó diaminobenzidina (Sigma) como sustrato, dando como resultado un teñido café. Después de lavado con agua destilada, los portaobjetos fueron contados-teñidos con hematoxilina durante 1 minuto. Subsecuentemente, los portaobjetos fueron lavados durante 30 segundos en agua destilada corriente y montados en glycergel (DAKO). El teñido inmunohistoquímico de biopsia clínica mostró teñido positivo en las secciones de linfoma no de Hodgkin, plasmacitoma, ccRcc y glioblastoma. Solamente las células malignas fueron positivas en cada case, el teñido normal adyacente no fue teñido.

Ejemplo 13: Producción de HuMAb defucosilados

Anticuerpos con cantidades reducidas de residuo de fucosilo se han mostrado que incrementan la habilidad de ADCC del anticuerpo. En este ejemplo, el HuMAb 2H5 ha sido producido que carece en residuos de fucosilo.

La línea de célula de CHO Ms704-PF, que carece del gen de fucosiltransferasa, FUT 8 (Biowa, Inc., Princeton, NJ) fue sometido a electroporación con un vector que expresa las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo 2H5. Clones resistentes al fármaco fueron seleccionados mediante cultivo en medio Ex-Cell 325-PF CHO (JRH Biosciences, Lenexa, KS) con L-glutamina 6 mM y 500 µg/ml de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los clones fueron seleccionados en cuanto a expresión de IgG mediante análisis de ELISA estándar. Dos clones separados fueron producidos, B8A6 y B8C11, que tenían velocidades de producción que fluctúa de 1,0 a 3,8 picogramos por célula por día.

Ejemplo 14: Determinación de actividad de ADCC de anticuerpo anti-CD70 defucosilado

En este ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD70 defucosilado y no defucosilado fue probado en cuanto a la habilidad para exterminar células CD70+ en presencia de células efectoras vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en un análisis de citotoxicidad de fluorescencia.

El anticuerpo monoclonal anti-CD70 humano 2H5 fue defucosilado como se describe anteriormente. Células efectoras humanas fueron preparadas a partir de sangre entera como sigue. Células mononucleares de sangre periférica humanas fueron purificadas a partir de sangre entera heparinizada mediante separación de Ficoll-paquete estándar. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10 % (medio de cultivo) y 200 U/ml de IL-2 humano e incubadas durante toda la noche a 37°C. El siguiente día, las células fueron recolectadas y lavadas una vez en medio de cultivo y resuspendidas a 2×10^7 células/ml. Las células CD70+ objetivo fueron incubadas con reactivo de BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 µl de BATDA por 1×10^6 células objetivo/ml en medio de cultivo complementado con probenecid 2.5 mM (medio de análisis) durante 20 minutos a 37°C. Las células objetivo fueron lavadas cuatro veces en PBS con HEPES 20 mM y probenecid 2,5 mM, centrifugadas y traídas a un volumen final de 1×10^5 células/ml en medio de análisis.

Las líneas de células CD70+ ARH-77 (leucemia de linfoblasto humano B; No. de Acceso ATCC CRL-1621), MEC-1 (leucemia de linfocitos B crónica humana; No. de Acceso DSMZ ACC 497), SU-DHL-6 (linfoma de linfocitos B humana, No. de Acceso DSMZ Acc572), IM-9 (linfoblasto B humano; No. de Acceso ATCC CCL-159) y HuT 78 (linfoma de linfocito cutáneo humano; No. de Acceso ATCC TIB-161), fueron probadas en cuanto a ADCC específica de anticuerpo al anticuerpo monoclonal anti-CD70 defucosilado y sin defucosilar 2H5 utilizando el análisis de emisión de presencia Delfia como sigue. La línea de célula objetivo ARH77 (100 µl de células objetivo marcadas) fue incubada con 50 µl de células efectoras y 50 µl ya sea de 2H5 o anticuerpo 2H5 defucosilado. Se usó una proporción de objetivo a efector de 1:50 en todos los experimentos. Un control de isotipo IgG1 humano fue usado como control negativo. Enseguida de una centrifugación de impulso de 2100 rpm e incubación de una hora a 37°C, los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados rápidamente otra vez y 20 µl de sobrenadante fueron transferidos a una placa de fondo plano, a la cual se agregaron 180 µl de solución de Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y leída en un lector de placa Fussion Alfa TRP (Perkin Elmer). El % de lisis fue calculado como sigue: (liberación de muestra — liberación espontánea * 100) / (liberación máxima - liberación espontánea), en el que la liberación espontánea es la fluorescencia de cavidades que solamente contienen células objetivo y la liberación máxima es la fluorescencia de cavidades que contienen células objetivo y han sido tratadas con Lysol al 3 %. El % de lisis específica de citotoxicidad celular para la línea celular ARH-77 es mostrada en la figura 24. Las líneas celulares que expresan CD70+ ARH-77, MEC-1, SU-DHL-6, IM-9 y HuT 78 mostraron citotoxicidad moderada por anticuerpo con el anticuerpo anti-CD70 HuMAb 2H5 y un porcentaje incrementado de lisis específica asociada con la forma defucosilada del anticuerpo anti-CD70 2H5. Además, se demostró que el anticuerpo anti-CD 16 bloquea el efecto de ADCC en la línea celular MEC-1. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 HuMAb defucosilados muestran citotoxicidad específica incrementada a las células que expresan CD70+.

Ejemplo 15: Determinación de actividad de ADCC de anticuerpo anti-CD70 utilizando un análisis de liberación de ^{51}Cr

En este ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD70 fue probado en cuanto a la habilidad para exterminar células de linfocito CD70+ Raji B en presencia de células efectoras vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en un análisis de liberación de ^{51}Cr .

Células mononucleares de sangre periférica humana (células efectoras) fueron purificadas de sangre entera heparinizada mediante separación de Ficoll-paquete estándar. Las células fueron resuspendidas a 2×10^6 /ml en medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10 % y 200 U/ml de IL-2 humano e incubadas durante toda la noche a 37°C. El siguiente día, las células fueron recolectadas y lavadas una vez en medio de cultivo y resuspendidas a 2×10^7 células/ml. Dos millones de células Raji objetivo (linfoma de Burkitt de linfocito humano B; No. de Acceso ATCC CCL-86) fueron incubadas con 200 µCi ^{51}Cr en 1 ml de volumen total durante 1 hora a 37°C. Las células objetivo fueron lavadas una vez, resuspendidas en 1 ml de medio, e incubadas a 37°C por 30 minutos adicionales. Después

de la incubación final, las células objetivo fueron lavadas una vez y traídas a un volumen final de 1×10^5 células/ml. Para el análisis de ADCC final, 100 μ l de células Raji marcadas fueron incubadas con 50 μ l de células efectoras y 50 μ l de anticuerpo. Se usó una proporción de objetivo a efector de 1:100 en todos los experimentos. En todos los estudios, el control de isotipo IgG1 humano fue usado como control negativo. En algunos estudios, el cultivo de PBMC fue separado igualmente en tubos que contienen ya sea 20 μ g/ml de anticuerpo CD16 anti-humano, un anticuerpo IgG1 de ratón irrelevante o ningún anticuerpo antes de agregar PBMC a la placa de análisis. Enseguida de una incubación de 15 minutos a 27°C, las células de sangre fueron usadas como se describe anteriormente sin lavado. Enseguida de una incubación de 4 horas a 37°C, los sobrenadantes fueron recolectados y contados en un contador Cobra II auto-gamma (Packard Instruments) con una ventana de lectura de 240-400 keV. Los conteos por minuto fueron graficados como función de concentración de anticuerpo y los datos fueron analizados mediante regresión no lineal, respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) utilizando elementos de programación Prism (San Diego, CA). El porcentaje de lisis fue determinado por la siguiente ecuación: % Lisis = $(\text{CPM de muestra} - \text{CPM sin anticuerpo}) / (\text{TritonX CPM} - \text{Sin anticuerpo CPM}) \times 100$. Una curva de titulación de anticuerpo para % de lisis específica de citotoxicidad calor para la línea de célula de Raji es mostrada en la figura 25. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 tienen un efecto de ADCC sobre la línea de célula de Raji. El valor de EC_{50} para el anticuerpo anti-CD70 contra células de Raji fue de 36,6 nM. Una gráfica de citotoxicidad sobre células de Raji en presencia de anticuerpo anti-CD16 es mostrada en la figura 26. Estos datos demuestran que el efecto de ADCC de anticuerpos anti-CD70 sobre células de Raji es dependiente de CD16.

Ejemplo 16: Determinación de actividad de ADCC de anticuerpo anti-CD70 sobre células T activadas

En este ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD70 defucosilado y no defucosilado fue probado en cuanto a la habilidad para exterminar células T activadas en presencia de células efectoras vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en un análisis de citotoxicidad de fluorescencia.

El anticuerpo monoclonal anti-CD70 humano 2H5 fue defucosilado como se describe anteriormente. Células efectoras humanas fueron preparadas como se describe anteriormente. Linfocitos T de bazo humanos fueron seleccionadas positivamente con perlas magnéticas recubiertas con anti-CD3 (Pureza >90 %). Las células fueron estimuladas con perlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 y 25 ng/ml de IL-2 en medio de Iscove + 10 % de FCS inactivado térmicamente durante 6 días. Las células fueron recolectadas y analizadas en cuanto a viabilidad mediante incorporación de yoduro de propidio (60 % viable) en células vivas y fueron recordadas y analizadas en cuanto a expresión de CD70 (-65 % CD70+ en células vivas) antes de inclusión en análisis de ADCC.

Los linfocitos T activados fueron probados en cuanto a ADCC específicas de anticuerpo al anticuerpo monoclonal anti-CD70 humano defucosilado y no defucosilado 2H5 utilizando el análisis de emisión de fluorescencia Delfia como sigue. Los linfocitos T activados objetivo (100 μ l de células objetivo marcadas) fueron incubadas con 50 μ l de células efectoras y 50 μ l ya sea de anticuerpo 2H5 o 2H5 defucosilado. Se usó una proporción de objetivo a efector de 1:50 en todos los experimentos. UN control de isotipo de IgG1 humano fue usado como control negativo. Enseguida de una centrifugación de impulso de 2100 rpm e incubación de una hora a 37°C, los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados rápidamente otra vez y 20 μ l de sobrenadante fueron transferidos a una placa de fondo plano, a la cual 180 μ l de solución de Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) fueron agregados y leídos en un lector de placas Fussion Alfa TRF (Perkin Elmer). El % de lisis fue calculado como sigue: $(\text{liberación de muestra} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$, en el que la liberación espontánea es la fluorescencia de cavidades que contienen solamente células objetivo y liberación máxima es la fluorescencia de cavidades que contienen células objetivo y han sido tratadas con Lysol al 3 %. El % de lisis específica de citotoxicidad celular para los linfocitos T activados es mostrado en la figura 27. Los linfocitos T activados mostraron citotoxicidad moderada por anticuerpo con el anticuerpo anti-CD70 HuMAb 2H5 y un porcentaje incrementado de lisis específica asociada con la forma defucosilada del anticuerpo anti-CD70 2H5. La citotoxicidad moderada por anticuerpo fue bloqueada mediante la adición de anticuerpo anti-CD16 tanto en las formas defucosilada como no defucosilada del anticuerpo anti-CD70. El IgG de control no tuvo efecto sobre la citotoxicidad. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 HuMAb defucosilados muestran citotoxicidad específica incrementada a células T activadas.

Ejemplo 17: Análisis de bloqueo para el enlace de CD70-CD27 de receptor-ligando

En este ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD70 fueron probados en cuanto a su habilidad para bloquear la interacción de CD70 con el ligando CD27 utilizando un análisis de bloqueo.

Las cavidades fueron recubiertas durante toda la noche con 100 μ l/cavidad de un anticuerpo anti-IgG (Fc-sp.) a 2 μ g/ml a 4°C. Las cavidades fueron bloqueadas con 200 μ l/cavidad BSA/PBS al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. A cada cavidad se agregaron 100 μ l/cavidad de CD27-Fc-his a 0,16 μ g/ml durante 1 hora a 37°C en tanto que se agita. Cada cavidad fue lavada 5 veces con 200 μ l/cavidad PBS/Tween 20 (0,05 % (v:v)). El anticuerpo anti-CD70 fue diluido en NHS al 10 % + BSA/PBS al 1 % y mezclado con CD70-myc-his a 0,05 μ g/ml, incubado durante 1 hora a temperatura ambiente y lavado 5 veces con 200 μ l/cavidad PBS/Tween 20 (0,05 % (v:v)). Un anticuerpo conocido que bloquea la interacción de CD70/CD27 fue usado como control positivo y un anticuerpo de control de isotipo fue usado como control negativo. La mezcla de CD70 y anticuerpo anti-CD70 fue bloqueada con un

anticuerpo anti-Fc y 100 µl/cavidad de CD70-myc-his + anticuerpo fue agregado a las cavidades que contienen CD27-Fc-his. La mezcla fue incubada durante 1 hora con agitación a 37°C. A la mezcla se agregan 100 µl/cavidad de anti-myc-HRP (diluido 1:1000 en NHS al 10 % + BSA/PBS al 1 %) e incubada durante 1 hora en tanto que se agita a 37°C. La señal fue detectada al agregar 100 µl sustrato de TMB, incubados durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, luego se agregan 75 µl de H₂SO₄ 0,25 M y los resultados fueron leídos a 450 nm. Los resultados son mostrados en la figura 28. Estos datos demuestran que algunos anticuerpos anti-CD70, en los que se incluye 2H5, 8B5 y 18E7, bloquean el enlace de CD70 a CD27, en tanto que otros anticuerpos no afectan la interacción entre CD70 y CD27.

Ejemplo 18: Tratamiento de modelo de xenoinjerto de tumor *in vivo* utilizando anticuerpos anti-CD70 desnudos

Ratones implantados con un tumor de linfoma fueron tratados *in vivo* con anticuerpos anti-CD70 desnudos para examinar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento del tumor.

Células ARH-77 (leucemia de linfoblasto humano B; No. de Acceso ATCC CRL-1621) y Raji (linfoma de Burkitt de linfocito B humano; No. de Acceso ATCC CCL-86) fueron expandidas *in vitro* utilizando procedimientos de laboratorio estándar. Ratones desnudos atímicos Ncr machos (Taconic, Hudson, NY) de entre 6-8 semanas de edad fueron implantados subcutáneamente en el flanco derecho con 5x10⁶ células ARH-77 o Raji en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Los ratones fueron pesados y medidos en cuanto a tumores tridimensionalmente utilizando un calibrador electrónico dos veces a la semana después del implante. Los volúmenes del tumor fueron calculados como altura x ancho x longitud/2. Los ratones con tumores ARH-77 que promedian 80 mm³ o tumores de Raji que promedian 170 mm³ fueron aleatorizados a grupos de tratamiento. Los ratones fueron dosificados intraperitonealmente con vehículo de PBS, anticuerpo de control de isotipo o HuMAb anti-CD70 desnudo 2H5 en el día 0. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando los tumores llegaron al punto final del tumor (2000 mm³). Los resultados son mostrados en la figura 29A (tumores de Raji) y 29B (tumores ARH-77). El anticuerpo anti-CD70 desnudo 2H5 prolongó el tiempo promedio para llegar al volumen de punto final del tumor (2000 mm³) y frenó el avance de crecimiento del tumor. Así, tratamiento con un anticuerpo anti-CD70 solo tiene un efecto inhibitor *in vivo* directo sobre el crecimiento del tumor.

Ejemplo 19: Tratamiento de modelo de xenoinjerto de tumor de linfoma *in vivo* utilizando anticuerpos anti-CD70 citotoxina-conjugados

Ratones implantados con un tumor de linfoma fueron tratados *in vivo* con anticuerpo anti-CD70 toxina-conjugados para examinar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento del tumor.

Células ARH-77 (leucemia de linfoblasto B humano; No. de Acceso ATCC CRL- 1621), Granta 519 (No. de Acceso DSMZ 342) y Raji (linfoma de Burkitt de linfocito humano B; No. de Acceso ATCC CCL-86) fueron expandidas *in vitro* utilizando procedimientos de laboratorio estándar. Ratones desnudos atímicos ncr machos (Taconic, Hudson, NY) de entre 6-8 semanas de edad fueron implantados subcutáneamente en el flanco derecho con 5 x10⁶ células ARH-77, 10 x10⁶ células Granta 519 o 5x10⁶ células Raji en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Los ratones fueron pesados y medidos en cuanto a tumores tridimensionalmente utilizando un calibrador electrónico dos veces a la semana después del implante. Los volúmenes del tumor fueron calculados como altura x ancho x longitud/2. Los ratones con tumores promediaron 80 mm³ (ARH-77), 220 mm³ (Granta 519) o 170 mm³ (Raji), fueron aleatorizados a grupos de tratamiento. Los ratones fueron dosificados intraperitonealmente con vehículo de PBS, anticuerpo de control de isotipo toxina-conjugado o HuMAb anti-CD70 toxina-conjugado 2H5 en el día 0. Ejemplos de compuestos de toxina que pueden conjugarse con los anticuerpos de la presente divulgación son descritos en solicitud de patente estadounidense provisional No. de Serie 60/720,499, presentada el 26 de septiembre de 2005. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando los tumores llegaron al punto final del tumor (2000 mm³). Los resultados son mostrados en la figura 30A (ARH-77), 30B (Granta 519) y 30C (tumores Raji). El anticuerpo anti-CD70 2H5 conjugado a una toxina prolongó el tiempo promedio para llegar al volumen de punto final del tumor (2000 mm³) y frenó el avance de crecimiento del tumor. Así, el tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD70-toxina tiene un efecto inhibitor *in vivo* directo sobre el crecimiento de tumor de linfoma.

Ejemplo 20: Reactividad cruzada de anticuerpo anti-CD70 con células de linfoma B rhesus

El análisis de FACS fue también empleado para acceder a la habilidad del anticuerpo anti-CD70 69A7 para reaccionar de manera cruzada con la línea de célula de linfoma CD70+ de mono rhesus, LCL8664 (ATCC N^o: CRL-1805). El enlace del anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 HuMAb 69A7 fue determinado al incubar 1x10⁵ células con 69A7 a una concentración de 1 µg/ml. Las células fueron lavadas y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. Un anticuerpo de control de isotipo fue usado como control negativo. Análisis citométricos de flujo fueron efectuados utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 31. Los resultados demuestran que el anticuerpo anti-CD70 69A7 reacciona de manera cruzada con células de linfoma CD70+ B de mono.

Ejemplo 21: Internalización de anticuerpo anti-CD70 después de la unión con células de carcinoma renal 786-O

5 La línea de célula de cáncer renal humana 786-O fue usada para probar la internalización de anticuerpos anti-CD70 HuMAb 69A7 y 2H5 después de la unión con las células utilizando tinte de inmunofluorescencia. Células 786-O (1x10⁴ células por 100 µl por cavidad en una placa de 96 cavidades) fueron cosechadas de un matraz de cultivo de tejido mediante tratamiento con tripsina/EDTA al 0,25 %, luego incubadas con cada uno de los anticuerpos anti-CD70 HuMAb a 5 µg/ml en solución reguladora del pH de FACS (medio de PBS + FBS al 5 %) durante 30 minutos sobre hielo. Un control de isotipo de IgG1 humano fue usado como control negativo. Enseguida de 2 lavados con medio, las células fueron resuspendidas en los medios (100 µl por cavidad) y luego incubadas con anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch Lab) a una dilución de 1:100 sobre hielo durante 30 minutos. Las células fueron ya sea impresas inmediatamente para morfología e intensidad de inmunofluorescencia bajo un microscopio fluorescente (Nikon) a 0 minutos e incubadas a 37°C para varias veces. La fluorescencia fue observada en las células teñidas con anticuerpos anti-CD70 HuMAb, pero no en el anticuerpo de control. Resultados similares fueron también obtenidos con anticuerpos anti-CD70 HuMAb conjugados FITC-directos en los análisis. Los resultados mostraron la aparición de fluorescencia sobre la membrana de la superficie celular con ambos anti-CD70 HuMabs a 0 minutos. Enseguida de una incubación de 30 minutos, la intensidad de fluorescencia de membrana disminuyó significativamente en tanto que la fluorescencia interna se incrementó. En el punto en el tiempo de 120 minutos, la fluorescencia de membrana no fue evidente, sino que en lugar de esto pareció estar presente en compartimientos intracelulares. Los datos demuestran que los anticuerpos anti-CD70 HuMAb puede ser internalizados específicamente después de la unión con células de tumor endógenas que expresan CD70.

Ejemplo 22: Anti-CD70 HuMAb bloquean el enlace de un anticuerpo anti-CD70 de ratón conocido

25 En este experimento, el anticuerpo anti-CD70 HuMAb 69A7 fue probado en cuanto a su habilidad para bloquear el enlace de un anticuerpo anti-CD70 de ratón conocido a células de carcinoma renal CD70+ 786-O. Células 786-O fueron incubadas con el anticuerpo anti-CD70 de ratón BU-69 (Ansell, Bayport, MN) a 1 µg/ml y el HuMAb 69A7 a 1, 5 o 10 µg/ml por 20 minutos sobre hielo. IgG1 y anticuerpo de control de isotipo de IgG2 fueron usados como controles negativos. Las células fueron lavadas dos veces y el enlace fue detectado con un Ab de IgG anti-humano FITC-marcado. Se efectuaron análisis citométricos de flujo utilizando una citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados son mostrados en la figura 32. El HuMAb anti-CD70 69A7 bloquea el enlace de un anticuerpo anti-CD70 de ratón de manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 23: Anti-CD70 de HuMAb inhibe respuesta inflamatoria

35 En este experimento, el anticuerpo anti-CD70 HuMAb de 2H5 fue probado en cuanto a inhibición de respuestas inflamatorias. Células CHO-S transfectadas establemente con CD32 de ratón (células CHO-S/mCD32) fueron transfectadas transitoriamente con un constructo de CD70 humano de plena longitud (células CHO-S/mCD32/CD70). La expresión de superficie fue confirmado mediante citometría de flujo utilizando Ab secundario de IgG anti-humano 2A5 y PE conjugado (datos no mostrados). Células de T de CD3+ de sangre periférica humana purificadas con equipo de enriquecimiento de células T humana RosetteSep[®] (Cat N° 15061; StemCell Technologies Inc) fueron estimuladas *in vitro* a 1x10⁶/cavidad con 1x10⁵ células CHO-S/mCD32 o CHO-S/mCD32/CD70 células/cavidad, 1 µg/ml de anti-hCD3 (clon OKT3; BD Bioscience) y diluciones seriales ya sea de HuMAb 2H5 o 2H5 no fucosilado (2H5 NF) en cavidades por triplicado de una placa de 96 cavidades. Después de 3 días alícuotas de sobrenadante fueron recolectadas y la secreción de interferón-gamma (INF-γ) fue medida mediante un equipo de ELISA cuantitativo (BD Biosciences). Las placas fueron pulsadas con 1 µCi/ml de ³H-timidina, incubadas durante 8 horas, las células fueron cosechadas y la incorporación de ³H-timidina fue leída sobre un contador Trilux[®] 1450 Microbeta (Wallac, Inc.). Un anticuerpo de control de isotipo de IgG1 fue usado como control negativo. Los resultados son mostrados en la figura 33. Ambos 2H5 y 2H5 NF inhibieron completamente la proliferación co-estimulada de CD70 de manera dependiente de la dosis (figura 33A). Los datos también muestran que la inhibición de 2H5 es específica a la co-estimulación de CD70 ya que 2H5 no tuvo ningún efecto sobre la proliferación moderada por anti-CD3 + CHO-S/mCD32. Ambos 2H5 y 2H5 NF inhibieron completamente la secreción de INF-γ co-estimulada de CD70 de manera dependiente de la dosis también (figura 33B). Los datos también muestran que la inhibición de 2H5 es específica a la co-estimulación de CD70 ya que 2H5 no tuvo ningún efecto sobre la secreción de INF-γ moderada por anti-CD3 + CHO-S/mCD32. Conjuntamente los datos muestran que 2H5 y 2H5 NF bloquean la co-estimulación de linfocitos T humanos de CD70.

60 Células mononucleares de sangre periférica B*3501+ de haplotipo de MHC de Clase I humano (PBMC) pre-seleccionadas en cuanto a respuesta de respuesta de linfocitos T específica de citomegalovirus (CMV) (Astarte, Inc.) fueron cultivadas en presencia de 25 ng/ml del péptido de CMV de enlace de B*3501 IPSINVHHY (Pro Immune, Oxford, Reino Unido) y diluciones seriales del HuMAb 2H5 durante 11 días. Los cultivos fueron analizados mediante citometría de flujo en cuanto a células T CD8+ mediante tinte de anti-CD8 PE conjugado (clon RPA-T8, BD Biosciences), en cuanto a células T de CD8+ específicas de péptido mediante tinte de oligómero pentamérico de MHC de Clase I APC marcado de péptido (F114-4B; Proimmune) y en cuanto a viabilidad mediante carencia de tinte de yoduro de propidio. Un anticuerpo de control de isotipo fue usado como control negativo. Los resultados son mostrados en la figura 34. 2H5 inhibió parcialmente la expansión de linfocitos T de CD8+ específica de péptido y

2H5 NF y Ab de Clase I anti-MHC de control positivo (clon W6/32; BD Bioscience) inhibieron completamente la expansión de linfocitos T de CD8+ específica de péptido (figura 34A). No hubo ninguna reducción significativa de la viabilidad celular total observada (figura 34B). No hubo ninguna reducción significativa de los números de célula CD8+ totales observado (figura 34C). Conjuntamente, los datos muestran que los efectos de 2H5 y 2H5 NF fueron

5 específicos a células T de CD8+ estimulada por péptido. Los Datos son representativos de un experimento adicional efectuado con el mismo donador.

B*3501+ PBMC pre-seleccionados en cuanto a respuesta de linfocitos T específica de citomegalovirus (CMV) (Astarte, Inc.) fueron cultivadas en presencia de 25 ng/ml del péptido de CMV de enlace de B*3501 IPSINVHHY (Proimmune) y 20 µg/ml de HuMAb 2H5 en la presencia o ausencia de diluciones seriales de un Ab de bloqueo funcional de CD16 anti-humano (FcRyIII) (clon 3G8; BD Biosciences) durante 11 días y luego fueron analizados mediante citometría de flujo en cuanto a números de células CD8+ específicas de péptido como se describe anteriormente. Los resultados son mostrados en la figura 35. La inversión dependiente de la dosis de 2H5 y 2H5 NF moderó la inhibición de expansión de linfocitos T de CD8+ específica de péptido mediante anti-CD 16 muestra que la inhibición de 2H5 y 2H5 NF fue moderada por medio de la interacción de 2H5 y 2H5 NF con células efectoras de CD16+. Se requirió aproximadamente 1000 veces más 3G8 para invertir la inhibición moderada por 2H5 NF en comparación con 2H5. No hubo inhibición de expansión de linfocitos T de CD8+ específica de péptido por el control de isotipo negativo sin consideración de la concentración de 3G8 y poco o ningún efecto de 3G8 sobre la inhibición de la expansión de linfocitos T de CD8+ específica de péptido mediante un control objetivo de bloqueo funcional W6/32.

Ejemplo 24: Tratamiento de modelo de xenoinjerto de tumor de carcinoma renal *in vivo* utilizando anticuerpos anti-CD70 citotoxina-conjugados

25 Ratones implantados con un tumor de carcinoma renal fueron tratados *in vivo* con anticuerpos anti-CD70 toxina-conjugados para examinar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento del tumor.

Células 786-O (No. de Acceso ATCC CRL-1932) y Caki-1 (No. de Acceso ATCC HTB-46) fueron expandidas *in vitro* utilizando procedimientos de laboratorio estándar. Ratones CB17.SCID machos (Taconic, Hudson, NY) de entre 6-8 semanas de edad fueron implantados subcutáneamente en el flanco derecho con 2,5 millones de células 786-O o Caki-1 en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Los ratones fueron pesados y medidos en cuanto a tumores tridimensionalmente utilizando un calibrador electrónico dos veces a la semana después del implante. Los volúmenes de tumor fueron calculados como altura x ancho x longitud. Los ratones con tumores que promedian 200 mm³ fueron aleatorizados en grupos de tratamiento. Los ratones fueron dosificados intraperitonealmente con vehículo PBS, anticuerpo de control de isotipo toxina-conjugado o HuMAb anti-CD70 toxina-conjugado 2H5 en el día 0. Ejemplos de compuestos de toxina que pueden conjugarse con los anticuerpos de la presente divulgación son descritos en la solicitud de patente estadounidense provisional No. de Serie 60/720,499, presentada el 26 de septiembre de 2005. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando los tumores llegaron al punto final del tumor (2000 mm³). Los resultados son mostrados en la figura 36A (786-O) y 36B (Caki-1). El anticuerpo anti-CD70 2H5 conjugado a una toxina prolongó el tiempo promedio para llegar al volumen de punto final del tumor (2000 mm³) y frenó el avance de crecimiento del tumor. Hubo menos de 10 % de cambio de peso corporal en los animales tratados. Así, el tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD70-toxina tiene un efecto inhibitor *in vivo* directo sobre el crecimiento de tumor de linfoma.

SEC ID N°:	SECUENCIA	SEC ID N°:	SECUENCIA
1	VH a.a. 2H5	26	VK CDR1 a.a. 2H5
2	VH a.a. 10B4	27	VK CDR1 a.a. 10B4
3	VH a.a. 8B5	28	VK CDR1 a.a. 8B5
4	VH a.a. 18E7	29	VK CDR1 a.a. 18E7
5	VH a.a. 69A7	30	VK CDR1 a.a. 69A7
6	VK a.a. 2H5	31	VK CDR2 a.a. 2H5
7	VK a.a. 10B4	32	VK CDR2 a.a. 10B4
8	VK a.a. 8B5	33	VK CDR2 a.a. 8B5
9	VK a.a. 18E7	34	VK CDR2 a.a. 18E7
10	VK a.a. 69A7	35	VK CDR2 a.a. 69A7
11	VH CDR1 a.a. 2H5	36	VK CDR3 a.a. 2H5
12	VH CDR1 a.a. 10B4	37	VK CDR3 a.a. 10B4
13	VH CDR1 a.a. 8B5	38	VK CDR3 a.a. 8B5
14	VH CDR1 a.a. 18E7	39	VK CDR3 a.a. 18E7
15	VH CDR1 a.a. 69A7	40	VK CDR3 a.a. 69A7
16	VH CDR2 a.a. 2H5	41	VH n.t. 2H5
17	VH CDR2 a.a. 10B4	42	VH n.t. 10B4
18	VH CDR2 a.a. 8B5	43	VH n.t. 8B5
19	VH CDR2 a.a. 18E7	44	VH n.t. 18E7
20	VH CDR2 a.a. 69A7	45	VH n.t. 69A7

ES 2 527 961 T3

21	VH CDR3 a.a. 2H5	46	VK n.t. 2H5
22	VH CDR3 a.a. 10B4	47	VK n.t. 10B4
23	VH CDR3 a.a. 8B5	48	VK n.t. 8B5
24	VH CDR3 a.a. 18E7	49	VK n.t. 18E7
25	VH CDR3 a.a. 69A7	50	VK n.t. 69A7
51	VH 3-30.3 línea germinal a.a.	54	VK L6 línea germinal a.a.
52	VH 3-33 línea germinal a.a.	55	VK L18 línea germinal a.a.
53	VH 4-61 línea germinal a.a.	56	VK L15 línea germinal a.a.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 5 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR1 como se muestra en la Figura 1A;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR2 como se muestra en la Figura 1A;
- 10 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR3 como se muestra en la Figura 1A;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 como se muestra en la Figura 1B;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR2 como se muestra en la Figura 1B; y
- 15 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR3 como se muestra en la Figura 1B;

en donde el anticuerpo se une específicamente a CD70.

20 2. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende las secuencias de CDR (a) a (f) de la reivindicación 1; y que comprende una región variable de cadena pesada que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de línea germinal 3-30.3 mostrada en la Figura 6; y/o una región variable de cadena ligera que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de línea germinal L6 mostrada en la Figura 9; en donde el anticuerpo se une específicamente a CD70.

25 3. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende:

- (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1A; y
- 30 (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1B; en donde el anticuerpo se une específicamente a CD70.

35 4. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se une al mismo epítipo en CD70 humano que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1A y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1B.

40 5. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

6. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.

45 7. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo está internalizado.

8. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde anticuerpo se une a una línea celular tumoral de carcinoma de células renales.

50 9. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 8, en el que la línea celular tumoral de carcinoma de células renales se selecciona de las líneas celulares 786-O, A-498, ACHN, Caki-1 y Caki-2.

10. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, uniéndose dicho anticuerpo con una línea celular tumoral de linfocitos B.

55 11. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 10, en el que la línea celular tumoral de linfocitos B se selecciona de las líneas celulares Daudi, HuT 78, Raji y Granta 519.

60 12. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo carece de restos de fucosa.

13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, ligado a un agente terapéutico.

65 14. El inmunoconjugado de la reivindicación 13, en el que el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radiactivo.

15. Una composición que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o el inmunocombinado de las reivindicaciones 13 o 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 16. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
17. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 16.
- 10 18. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 17.
19. Un método para la preparación de un anticuerpo anti-CD70 que comprende expresar el anticuerpo en la célula huésped de la reivindicación 18 y aislar el anticuerpo de la célula huésped.
- 15 20. Un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en un método para inhibir el crecimiento de células de tumor, *in vivo*.
21. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que las células tumorales se seleccionan de carcinomas de células renales (RCC), RCC de célula clara, glioblastoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas de célula grande anaplásicos (ALCL), mieloma múltiple, linfomas de linfocitos T cutáneos, linfomas de célula escindida pequeña nodular, linfomas linfocíticos, linfomas de linfocitos T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de linfocitos T (ATLL), leucemia de linfocitos T adulta (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfoma de célula grande difuso de linaje de linfocitos B, linfoma de linfocitos T semejante a linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en cavidad corporal asociados a VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas sin diferenciar de la rinofaringe, tumor de Schmincke, enfermedad de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfomas de linfocitos B.
- 20 25 30 35 22. Un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en un método para tratar inflamación.
23. Uso de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células de tumor o tratar la inflamación.
24. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde las células de tumor son carcinomas de células renales (RCC).

Regiones VH 2H5 anti-CD70

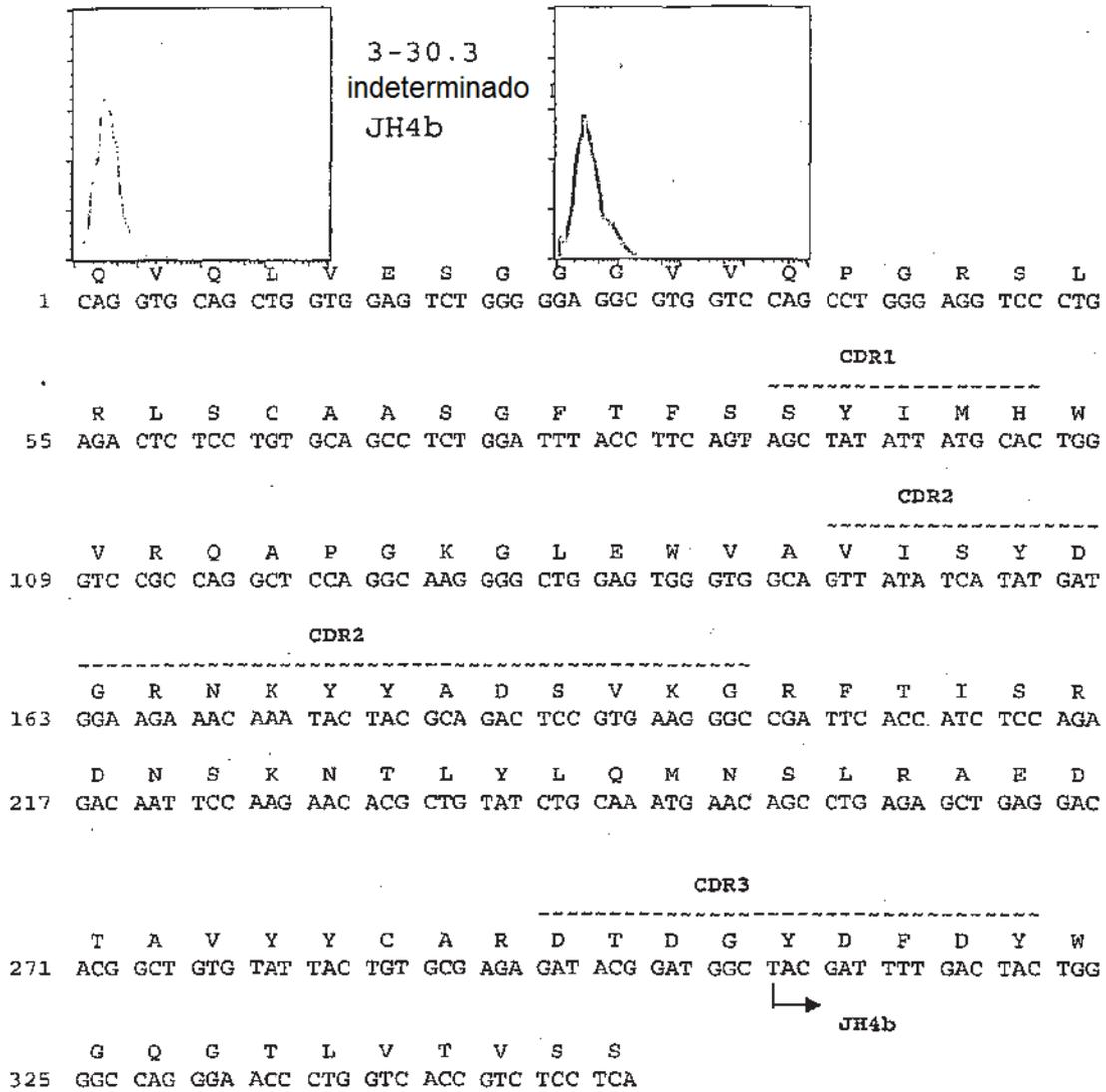


Figura 1A

Regiones VK 2H5 anti-CD70

Segmento V: L6
 Segmento J: JK4

```

      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 Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC 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 F S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC 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 CAG CAG

      CDR3
      -----
      R T N W P L T F G G G T K V E I K
271  CGT ACC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

└─→

Figura 1B

Regiones VK 10B4 anti-CD70

Segmento V: L18

Segmento J: JK3

```

      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
1  GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
55  GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P G K A P K F L I Y D A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG TTC TTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA 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 TGT CAA CAG

      CDR3
      -----
      F N S Y P F T F G P G T K V D I K
271 TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
      ↓
      →
    
```

Figura 2B

Regiones 18E7 anti-CD70

Segmento V: 3-33

Segmento D: 3-10

Segmento J: JH4b

```

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

                                     CDR1
                                     -----
      R L S C A A S G F T F S D H G M H W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGC GAC CAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
      V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

      CDR2
      -----
      G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
      T A V Y Y C A R D S I M V R G D Y W
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCT ATT ATG GTT CCG GGG GAC TAC TGG
                                     |
                                     → JH4b

      G Q G T L V T V S S
325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 4A

Regiones VK 18E7 anti-CD70

Segmento V: L15

Segmento J: JK4

```

      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC 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 A W Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC 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 N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
      |
      └─→
    
```

Figura 4B

VH 69A7 anti-CD70

Segmento V: 4-61

Segmento D: 4-23

Segmento J: JH4b

```

1      Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
      CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                          CDR1
-----
55     S L T C T V S G G S V S S D Y Y Y W
      TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GAT TAT TAC TAC TGG

      CDR1                                          CDR2
      -----
109    S W I R Q P P G K G L E W L G Y I Y
      AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG CTT GGG TAT ATC TAT

                                          CDR2
-----
163    Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S
      TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA

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

                                          CDR3
-----
271    D T A V Y Y C A R G D G D Y G G N C
      GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GAT GGG GAC TAC GGT GGT AAC TGT

      CDR3
      -----
325    F D Y W G Q G T L V T V S S
      TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figura 5A

VK 69A7 anti-CD70

Segmento V: L6
 Segmento J: JK4

```

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

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

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

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

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

      CDR3
      -----
271    R S N W P L T F G G G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

Figura 5B

Regiones V_H 2H5 y 10B4 anti-CD70

Línea germinal 3-30.3: Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q
 VH 2H5: - - - - - I - - - - - G Y - - - - -
 VH 10B4: - - - - - I - - - - - G Y - - - - -

Línea germinal 3-30.3: A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
 VH 2H5: - - - - - R - - - - - I - - - - -
 VH 10B4: - - - - - R - - - - - I - - - - -

Línea germinal 3-30.3: L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
 Línea germinal JH4b: - - - - - D T D G Y D - - - - - Y F D Y W G Q G T L
 VH 2H5: - - - - - D T D G Y D - - - - -
 VH 10B4: - - - - - E G P Y S N - L - - - - -

Línea germinal 3-30.3: V T V S S
 VH 2H5: - - - - - (JH4b)
 VH 10B4: - - - - - (JH4b)

Figura 6

Región VK 2H5 mAb1 anti-CD70

```

          CDR1
Línea germinal L6:  E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
VK 2H5 n° 1:      - - - - -

          CDR2
Línea germinal L6:  W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
VK 2H5 n° 1:      - - - - -

          CDR3
Línea germinal L6:  T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W
Línea germinal JK4:  L T F G G G T
VK 2H5 n° 1:      - - - - - T - - - - P - - - -

Línea germinal JK4:  K V E I K
VK 2H5 n° 1:      - - - - - (JK4)
    
```

Figura 9

Región VK 69A7 anti-CD70

Línea germinal L6 VK 69A7	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	CDR1
Línea germinal L6 VK 69A7	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	CDR2
Línea germinal L6 VK 69A7	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q R S N	CDR3
Línea germinal L6 VK 69A7	W P L T F G G G T K V E I K	(JK4)

Figura 12

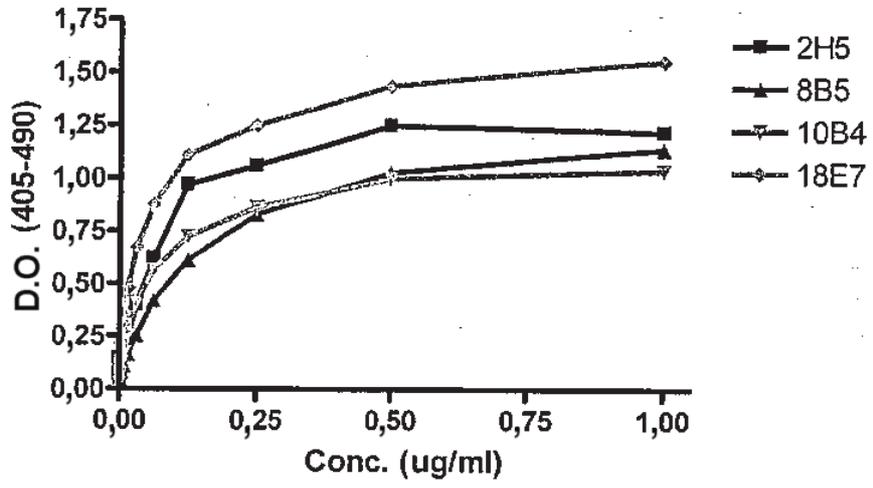


Figura 13

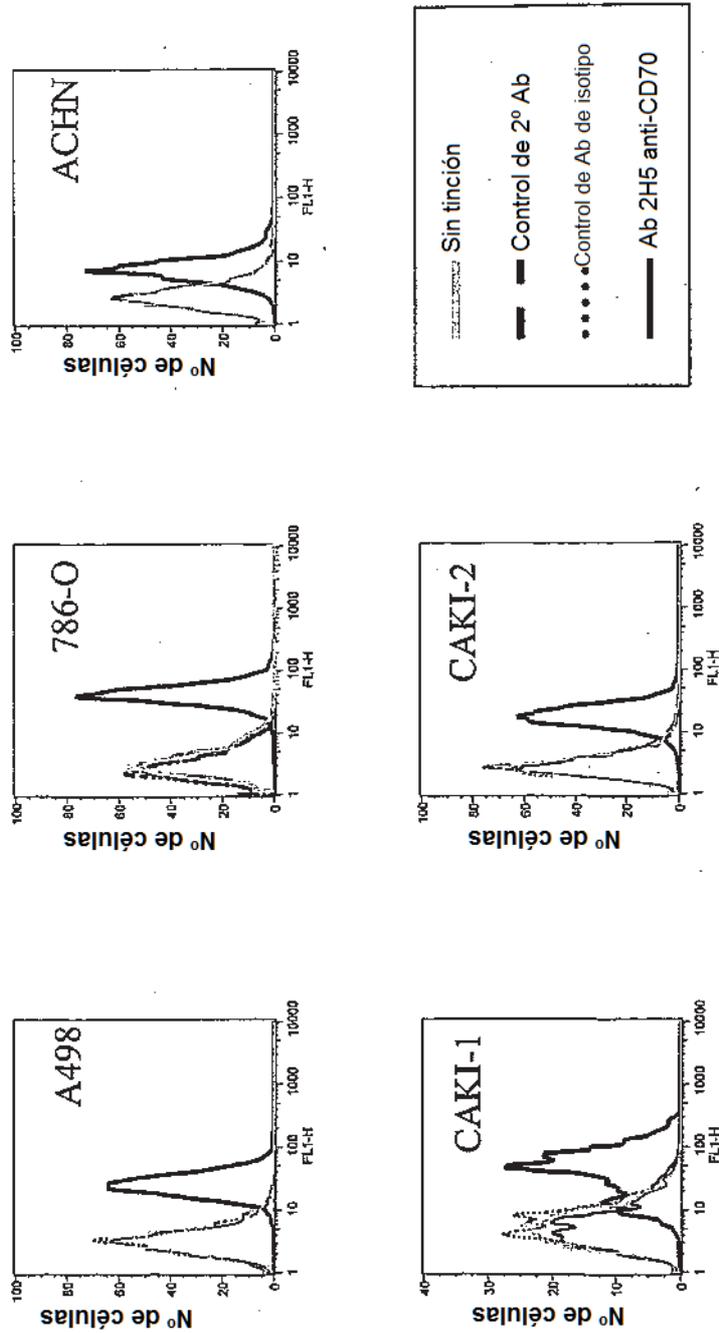


Figura 14

Figura 15A

Valoración de FACS de 786-O

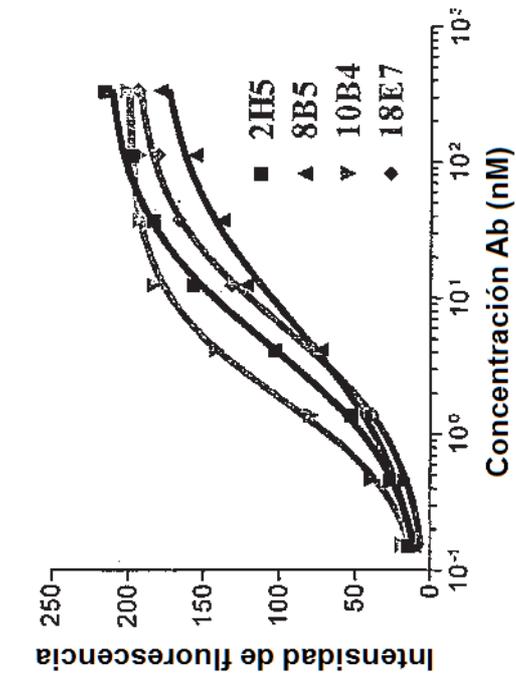
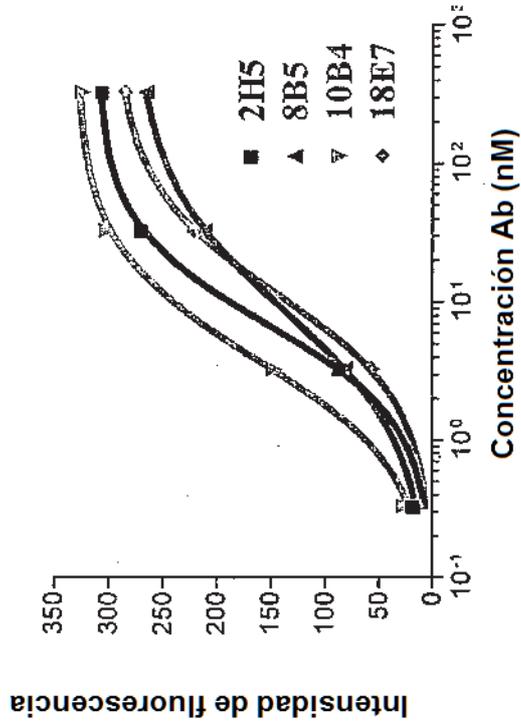


Figura 15B

Valoración de FACS de A498



69A7 se une con la línea celular de cáncer renal humano CD70+ (786-O)

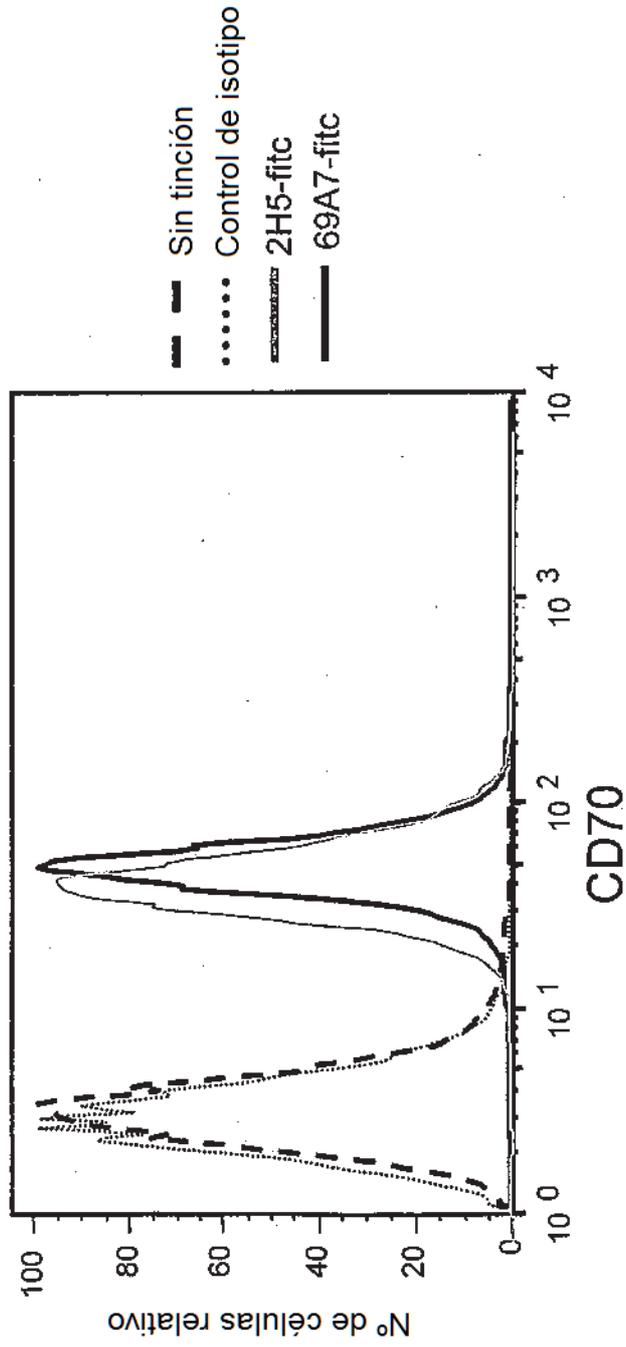


Figura 15C

**Valoración de Ab anti-CD70, 69A7
en células 786-O**

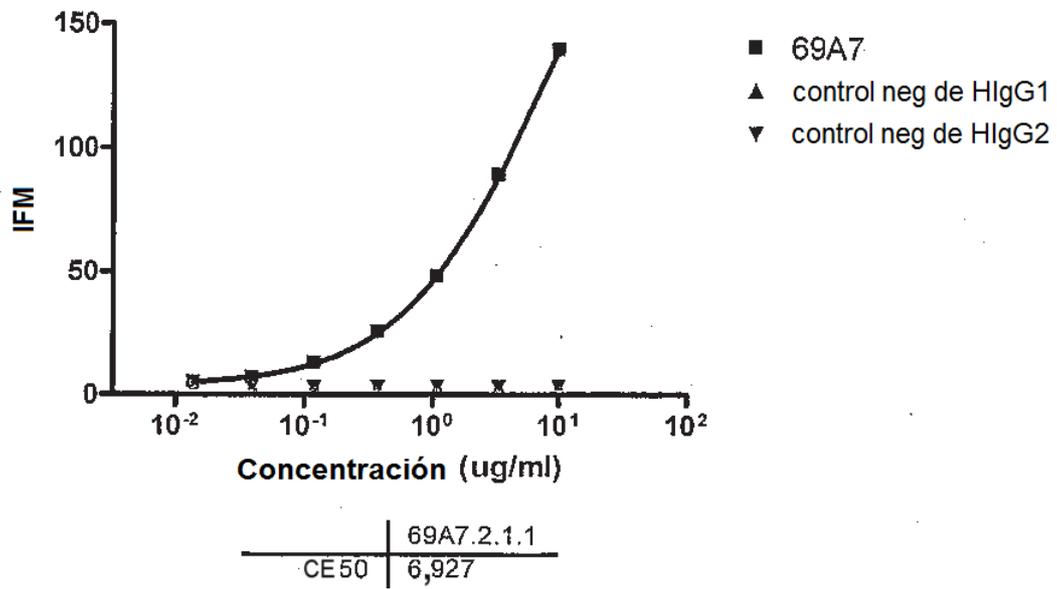


Figura 15D

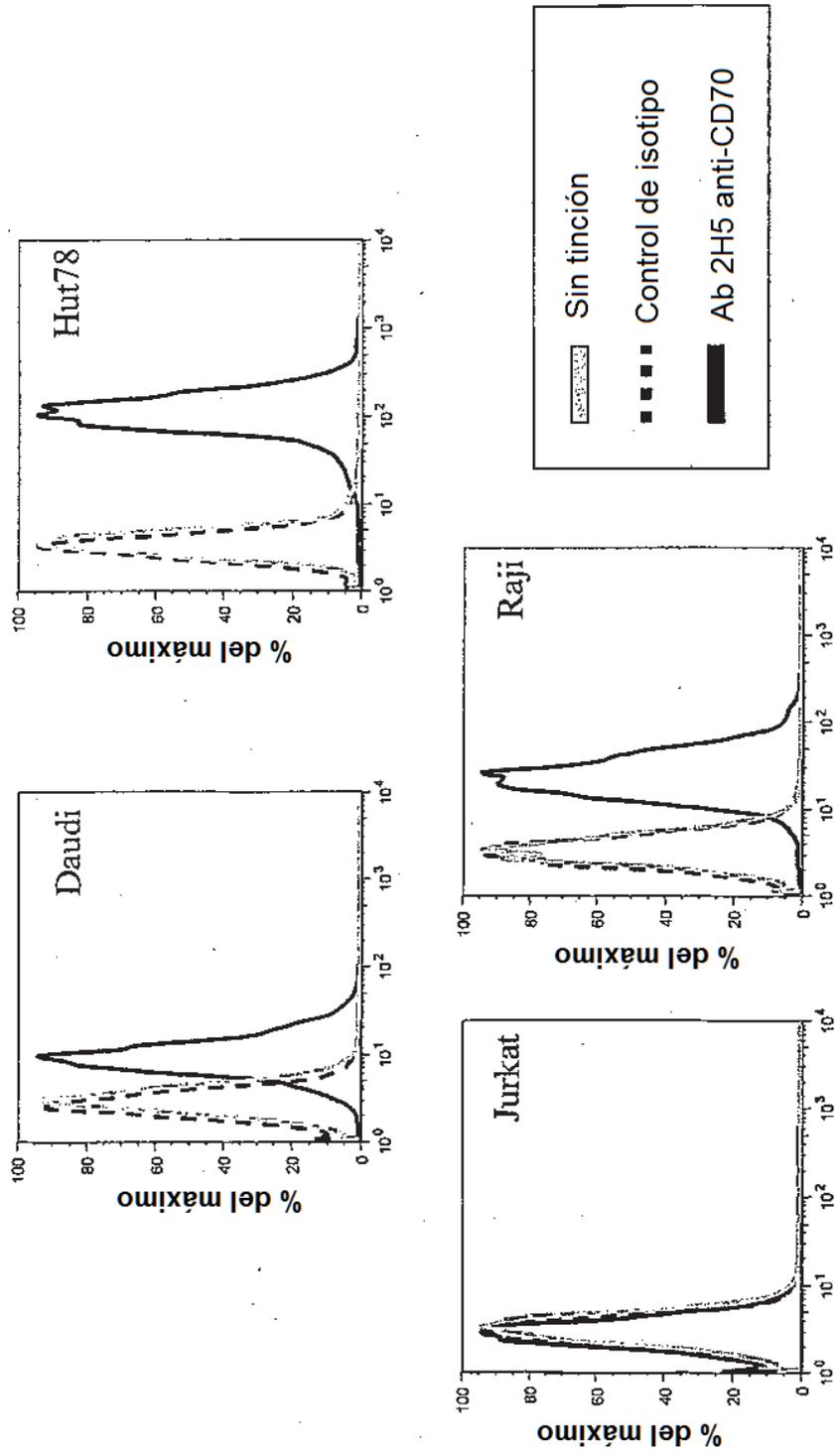


Figura 16

FACS en células Raji

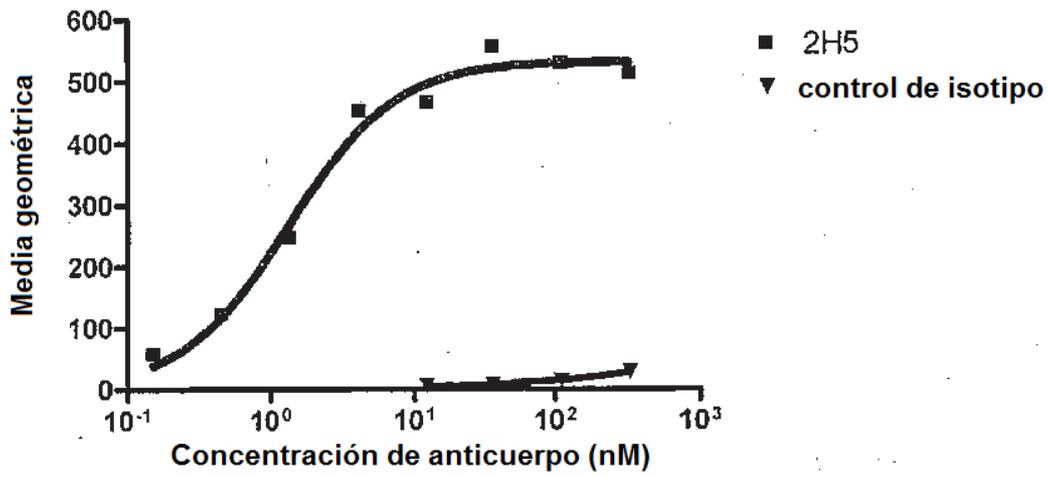


Figura 17A

FACS en células Granta-519

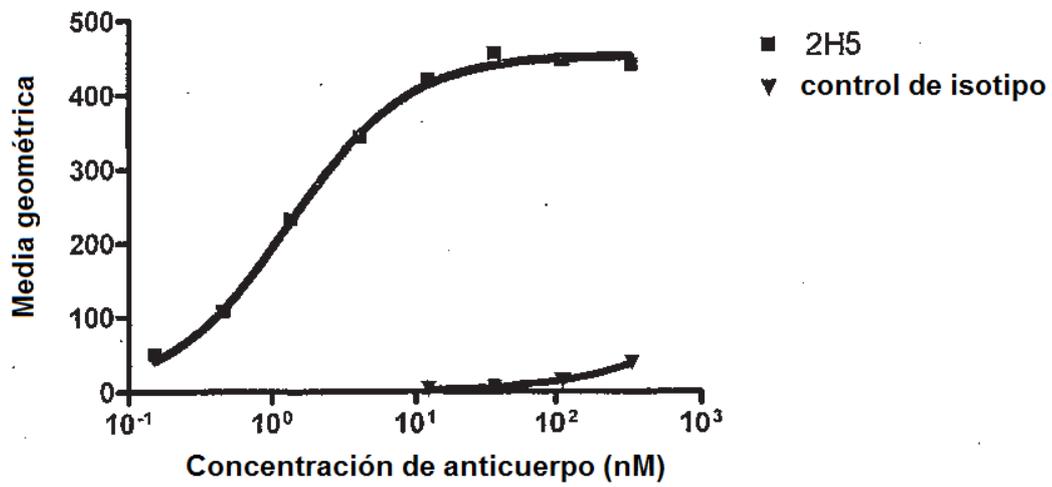


Figura 17B

69A7 se une con la línea celular de linfoma B humano CD70+ (células Raji)

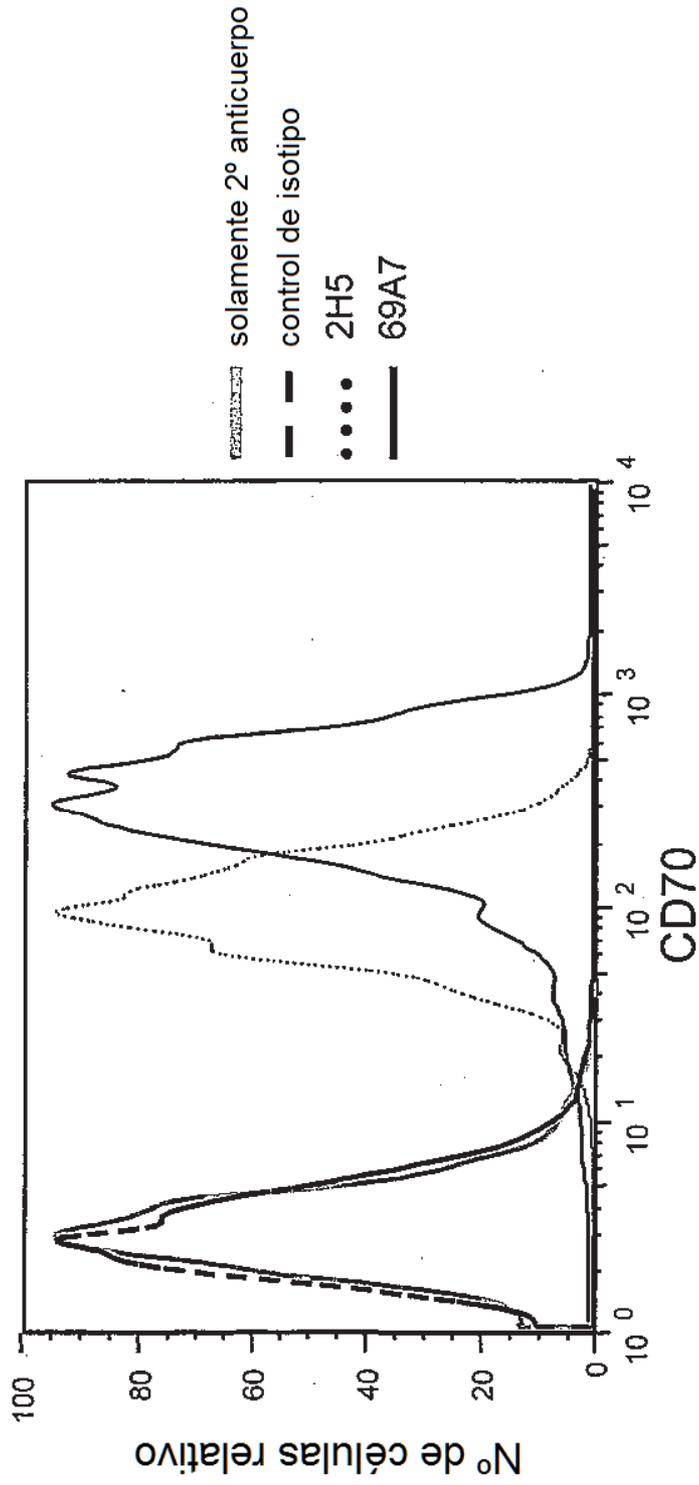


Figura 17C

69A7 y 2H5 reaccionan con un epítipo similar de CD70 en células Raji

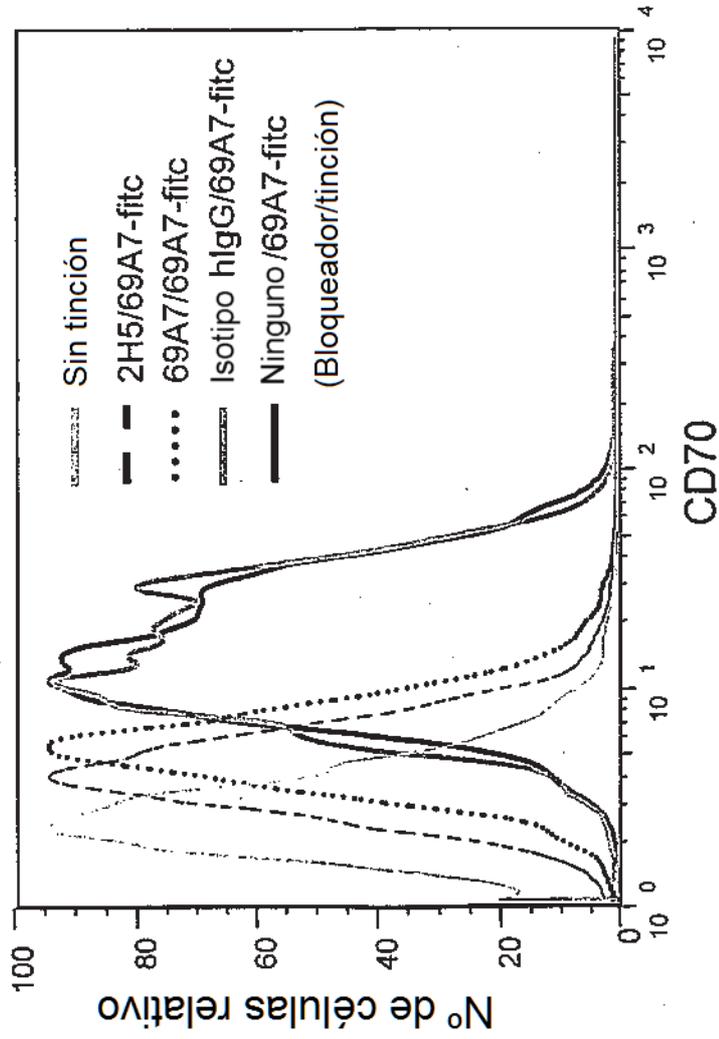


Figura 17D

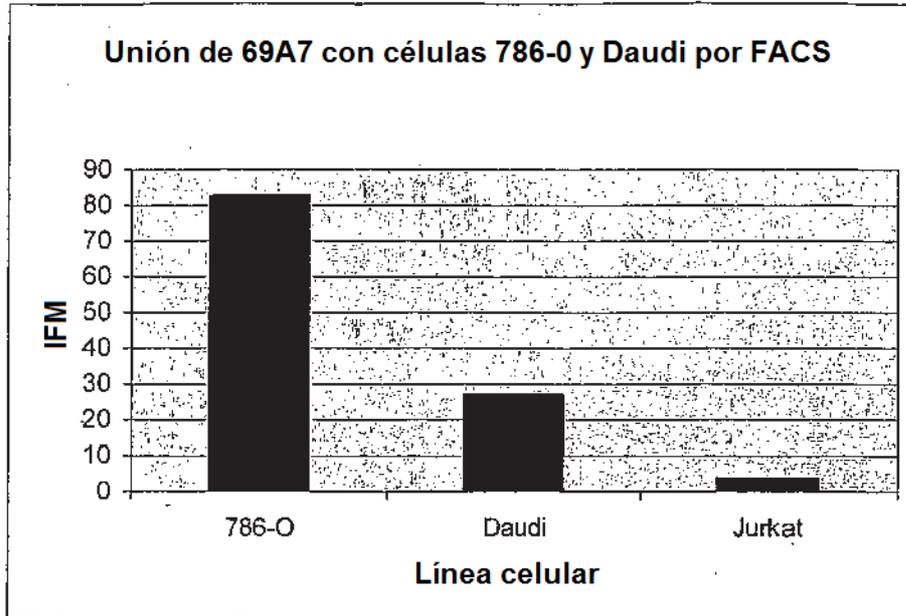


Figura 17E

**Ensayo de HumZap de 72 h
de 786-O**

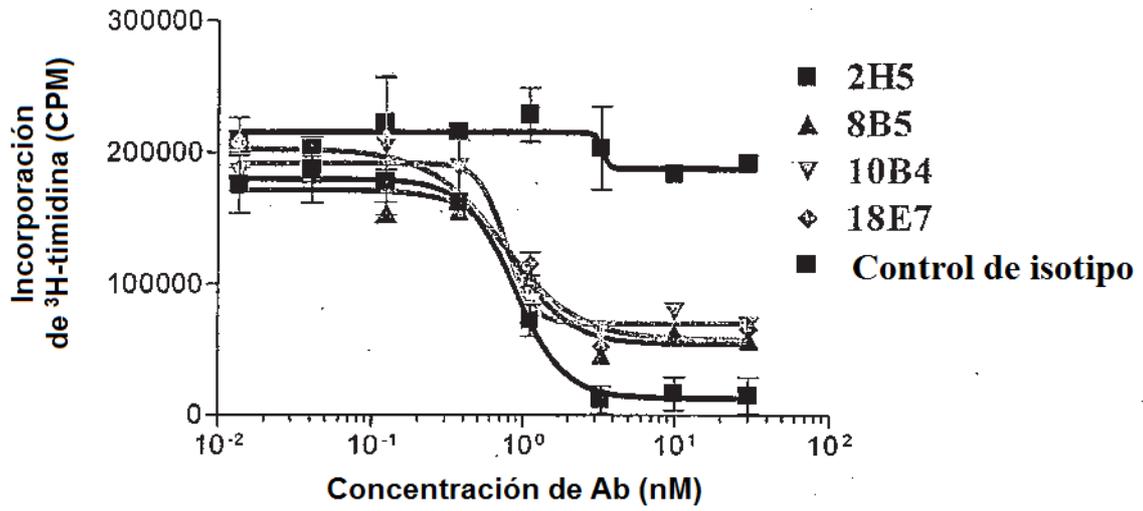


Figura 18

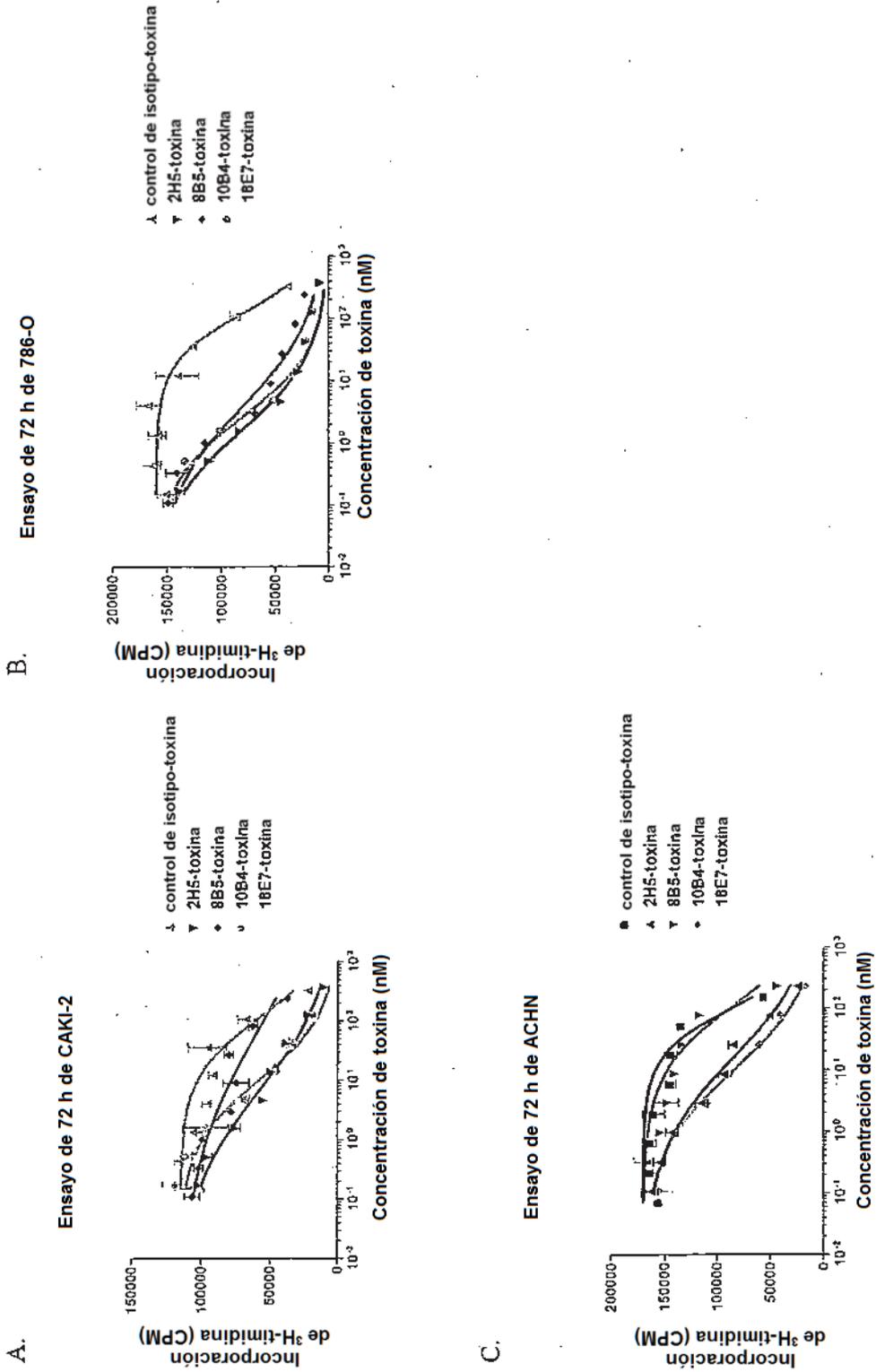


Figura 19

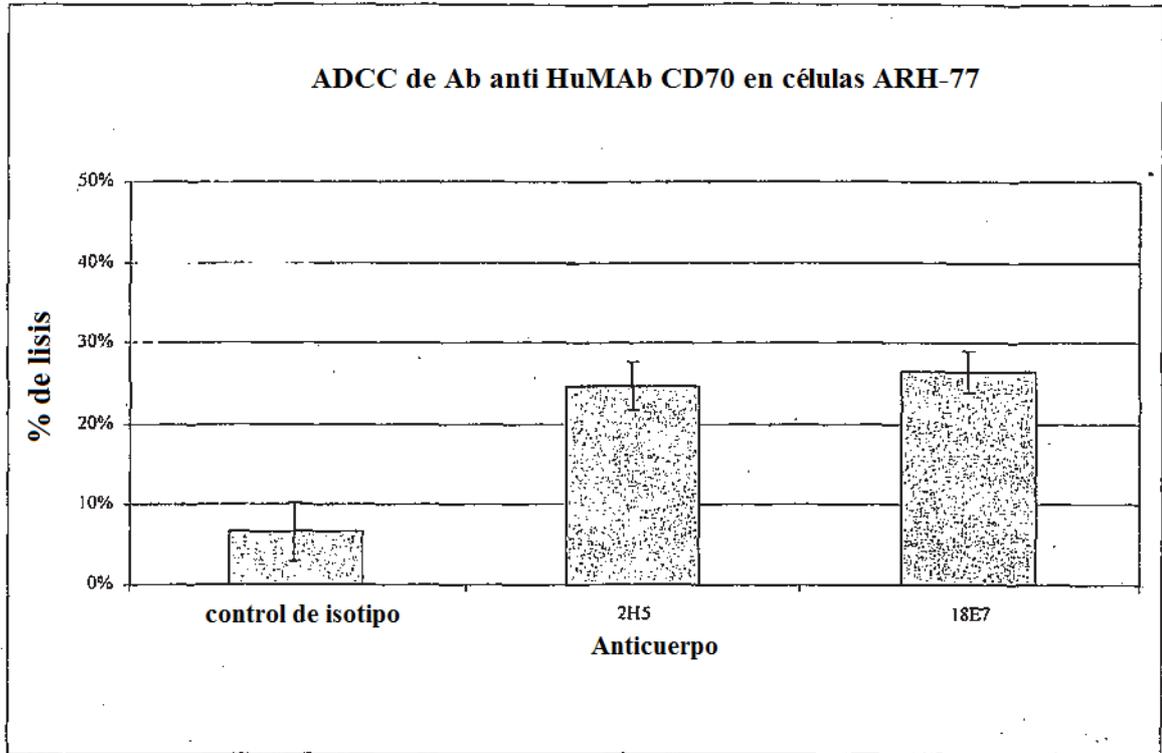


Figura 20A

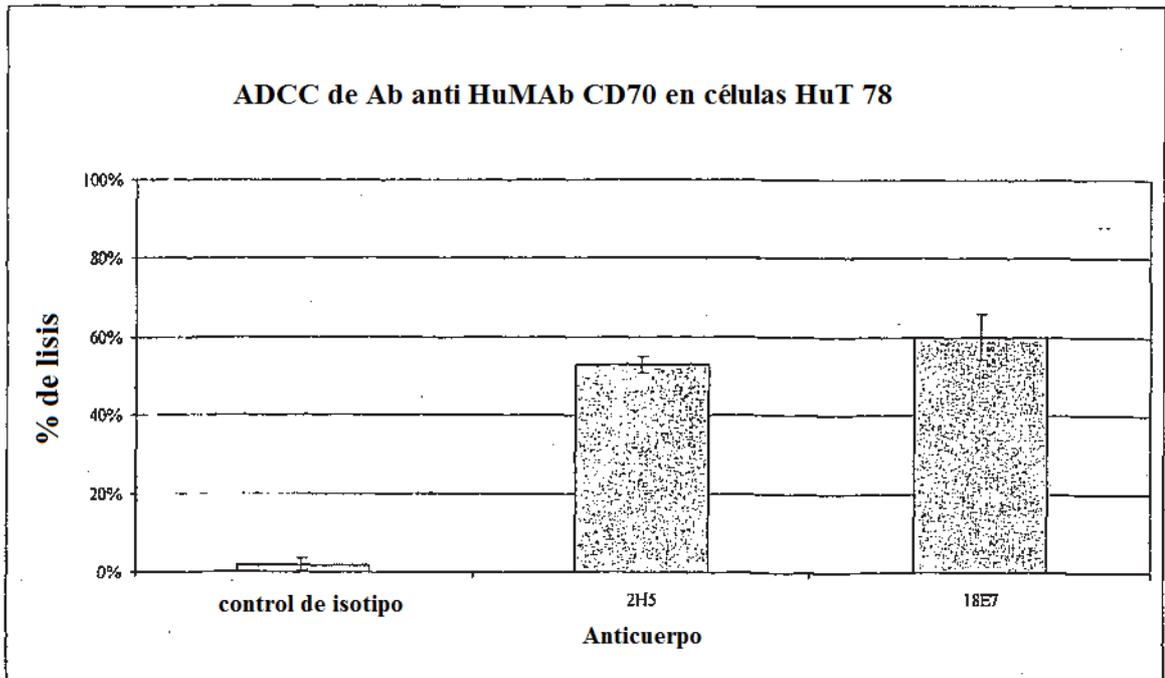


Figura 20B

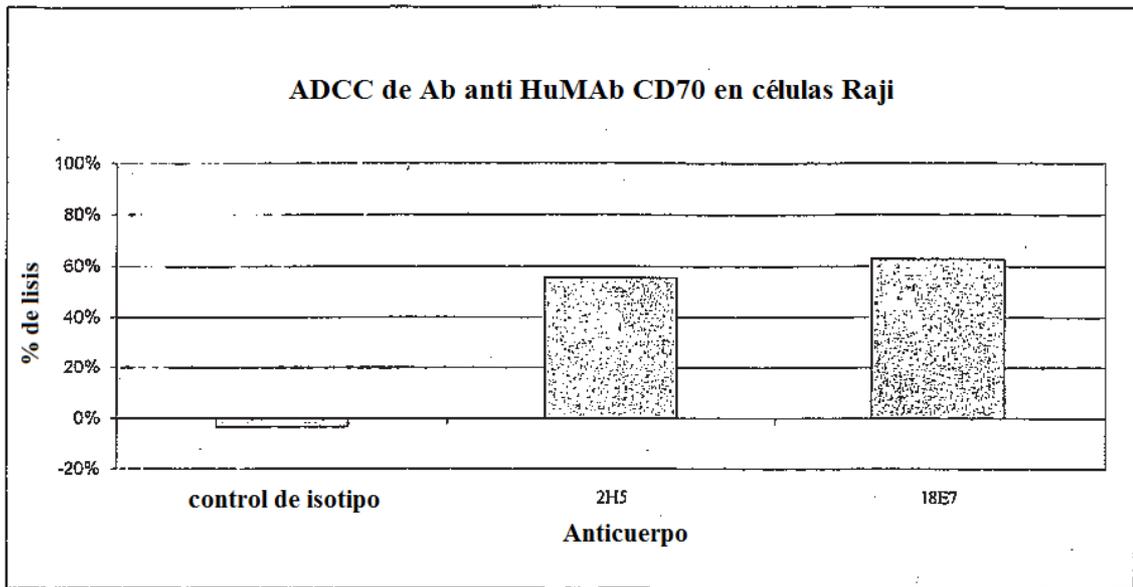


Figura 20C

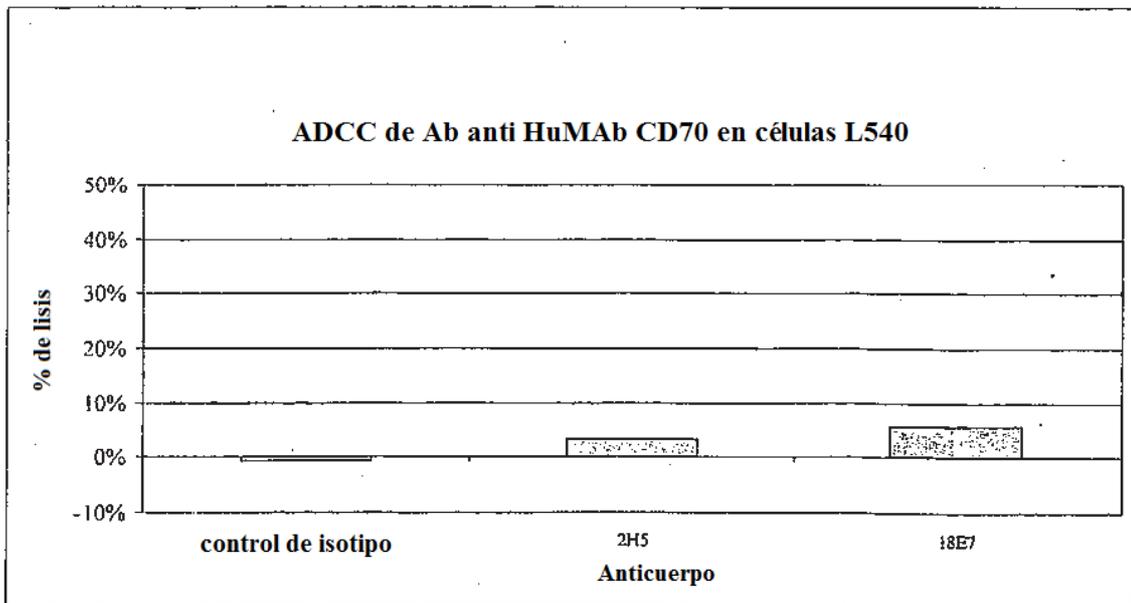


Figura 20D

Conjugado de toxina-2H5

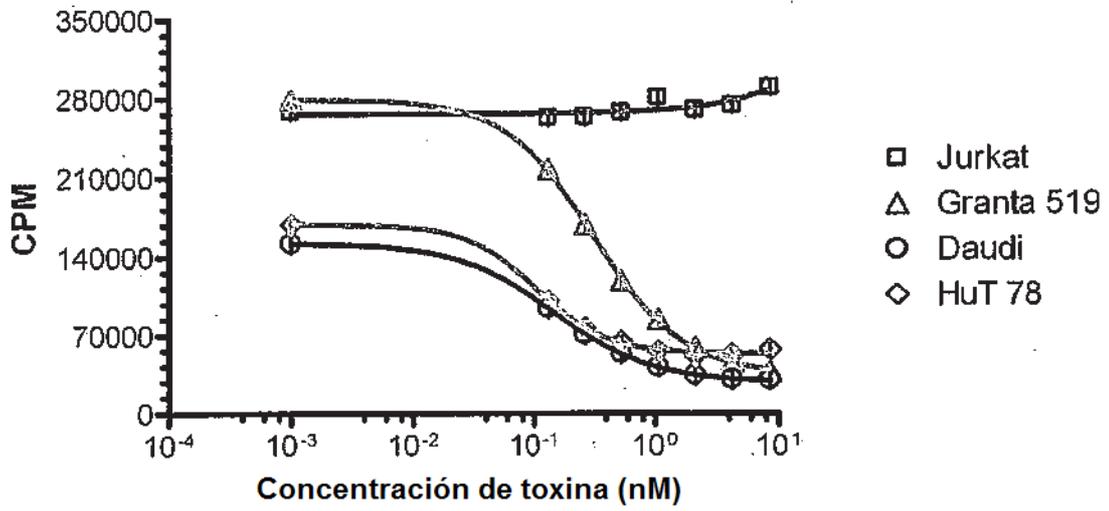


Figura 21

Ensayo de 72 h con lavado de 3 h de Raji

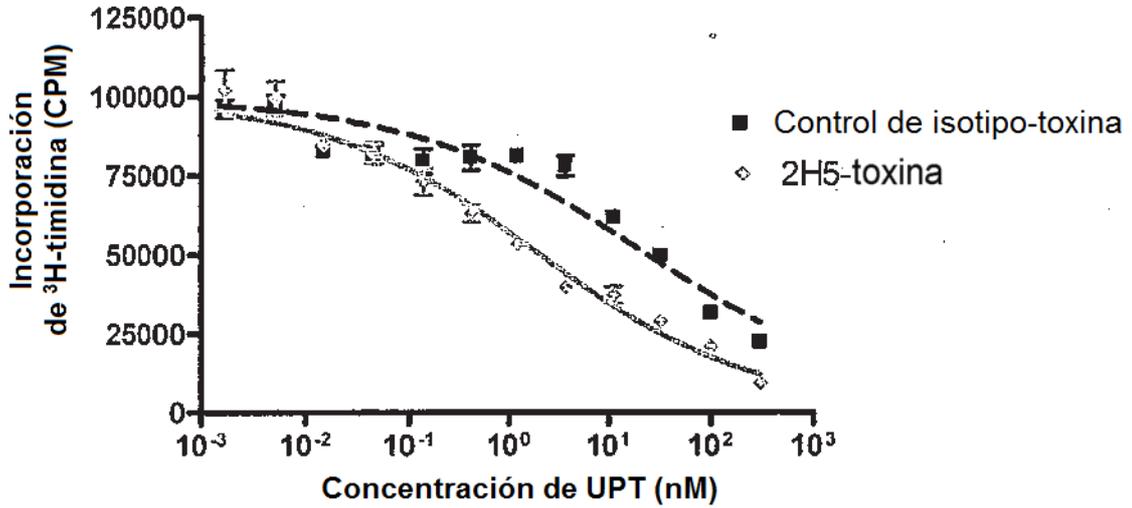


Figura 22A

Ensayo de 72 h continuo de Raji

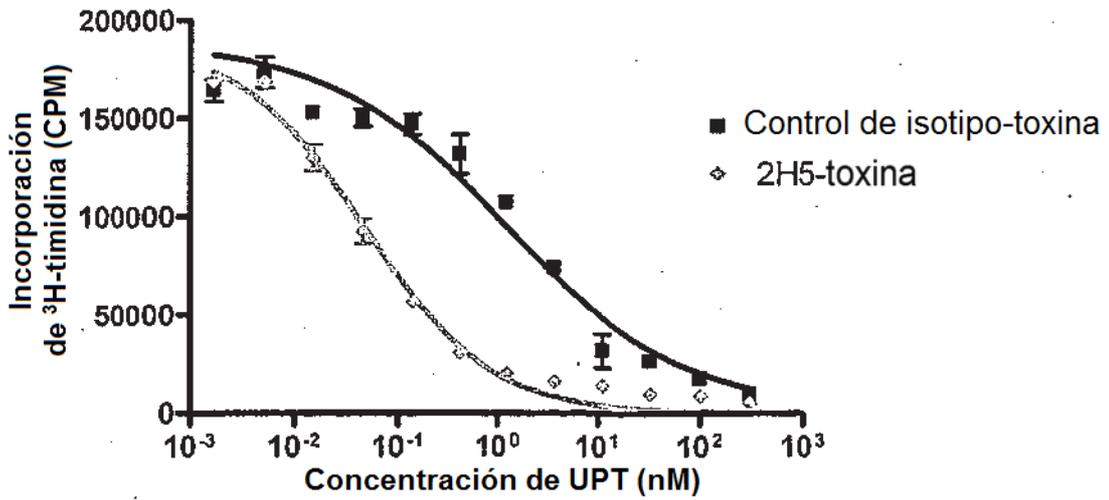


Figura 22B

Tumores A498

(mediana del volumen tumoral, 0,3 μ moles de toxina/kg)

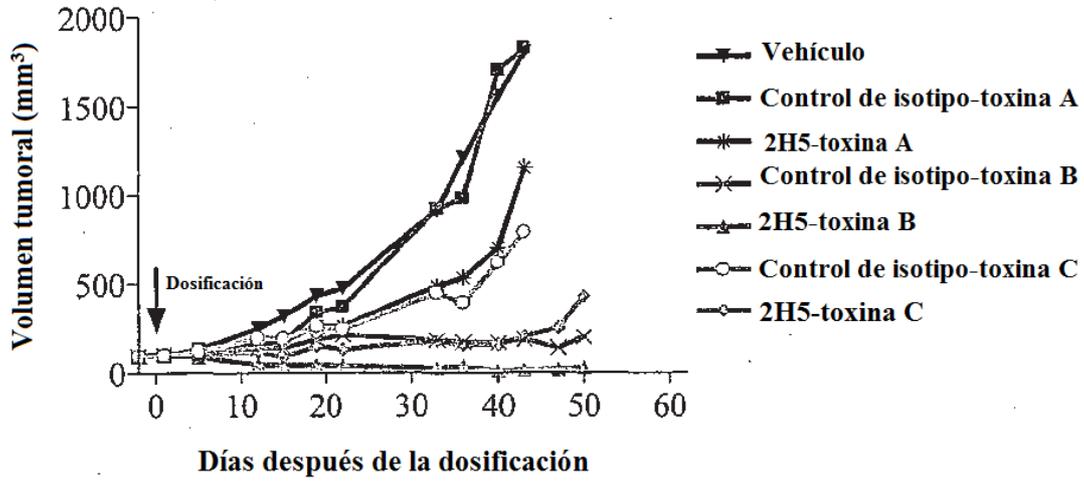


Figura 23A

Tumores ACHN

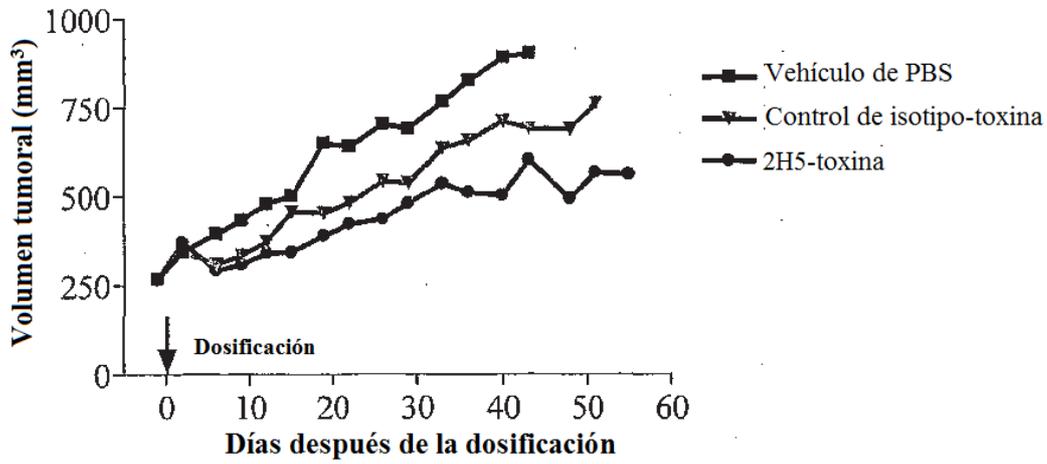


Figura 23B

ADCC en células ARH77

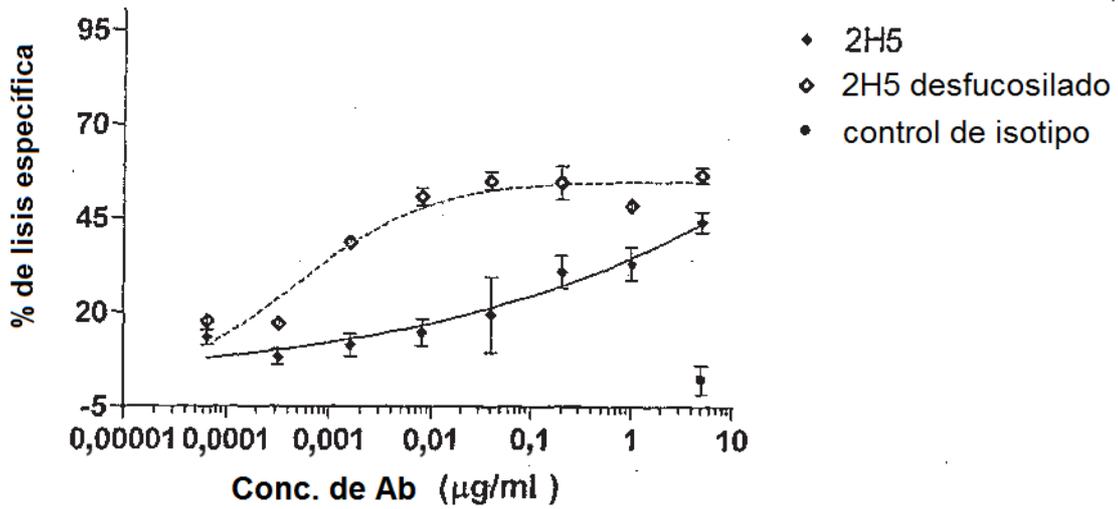


Figura 24A

ADCC en células MEC-1

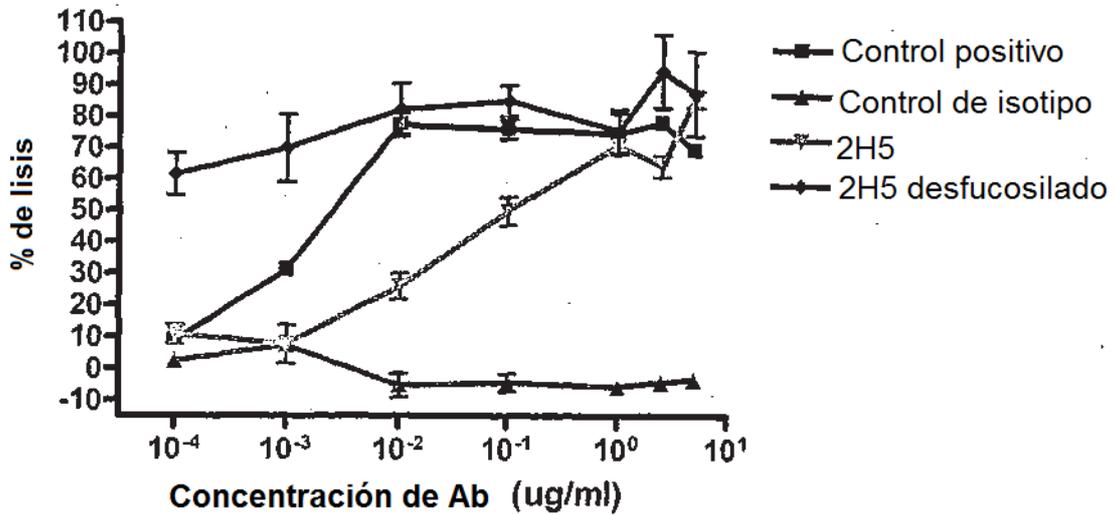


Figura 24B

ADCC en células MEC-1 con anti-CD16

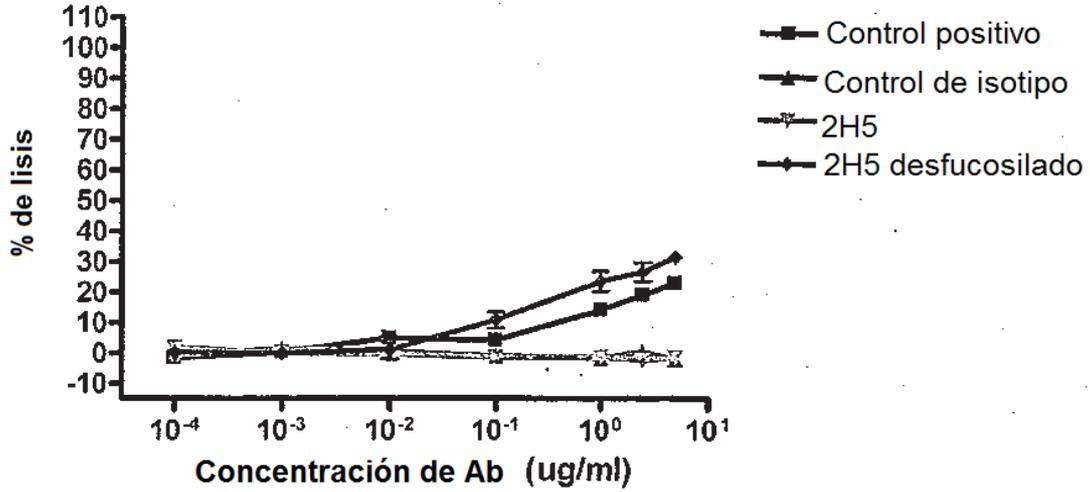


Figura 24C

ADCC en células Su-DHL-6

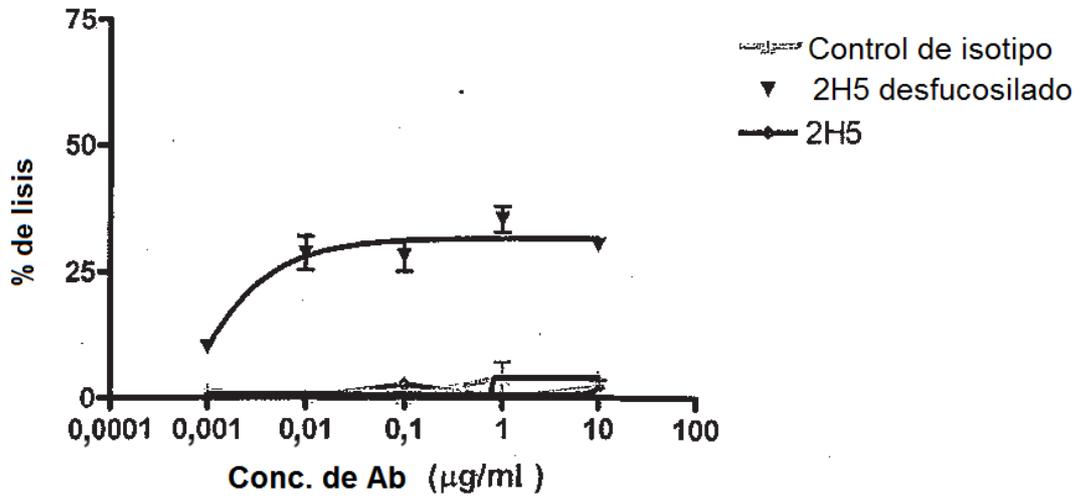


Figura 24D

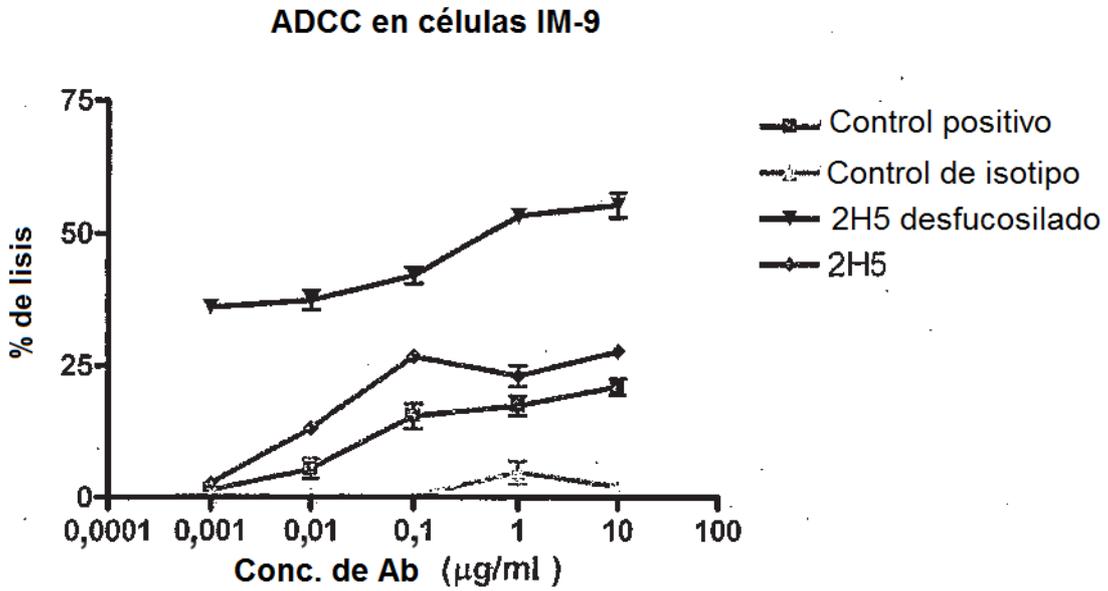


Figura 24E

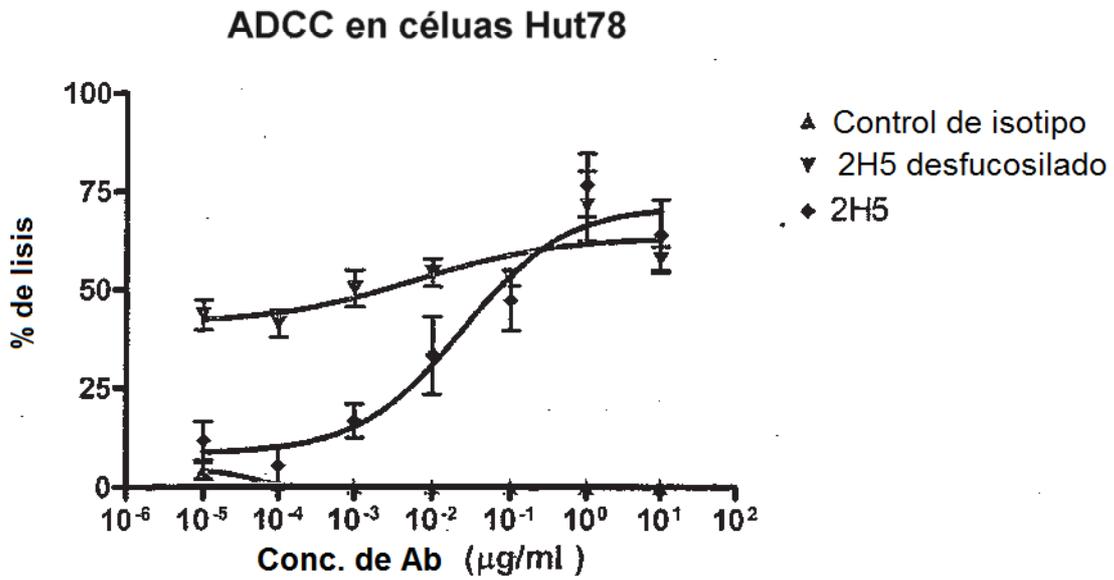


Figura 24F

ADCC en células Raji

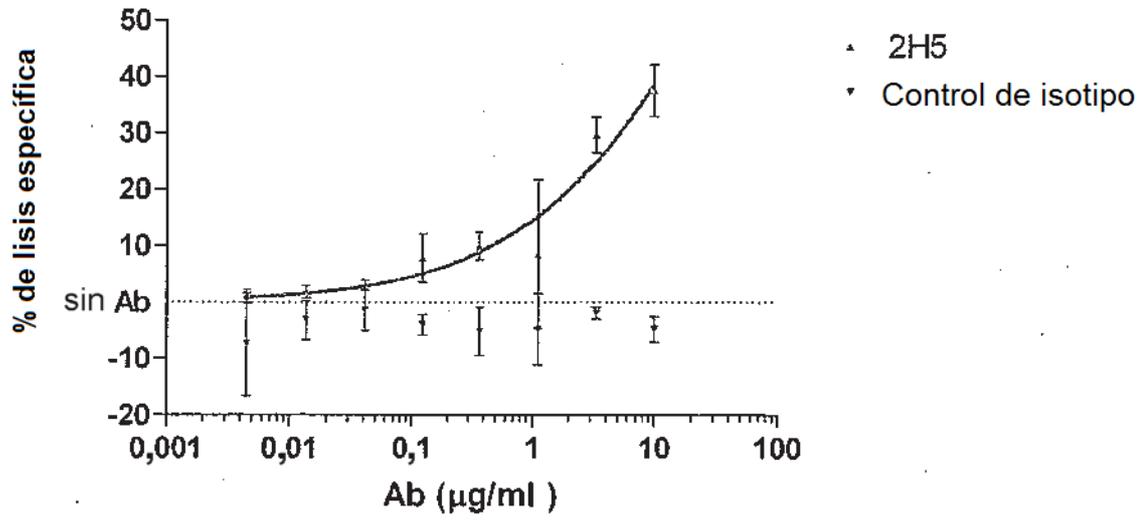


Figura 25

ADCC en células Raji con bloqueo de CD16

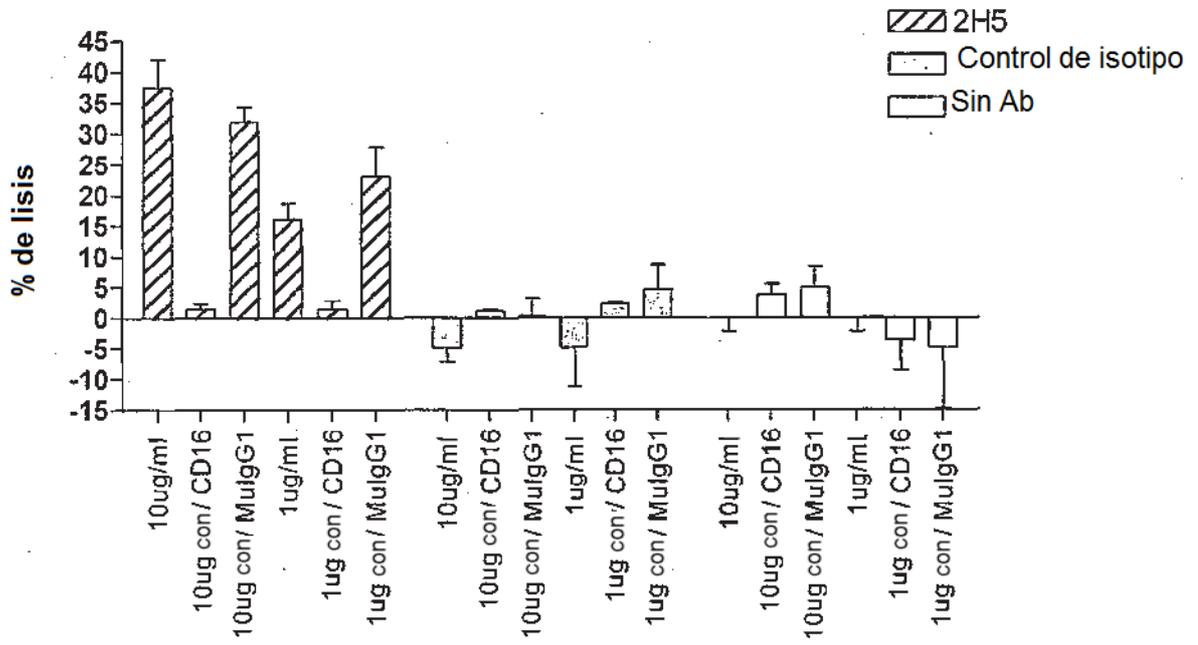


Figura 26

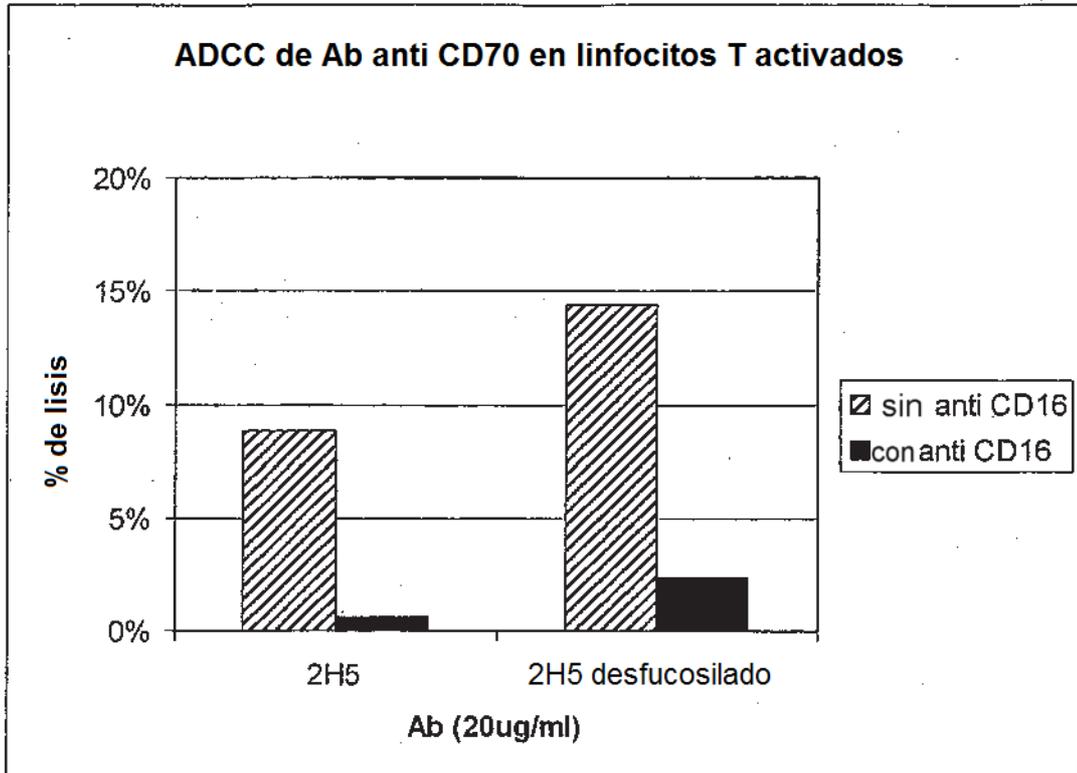


Figura 27

Ensayo de bloqueo de CD27-CD70

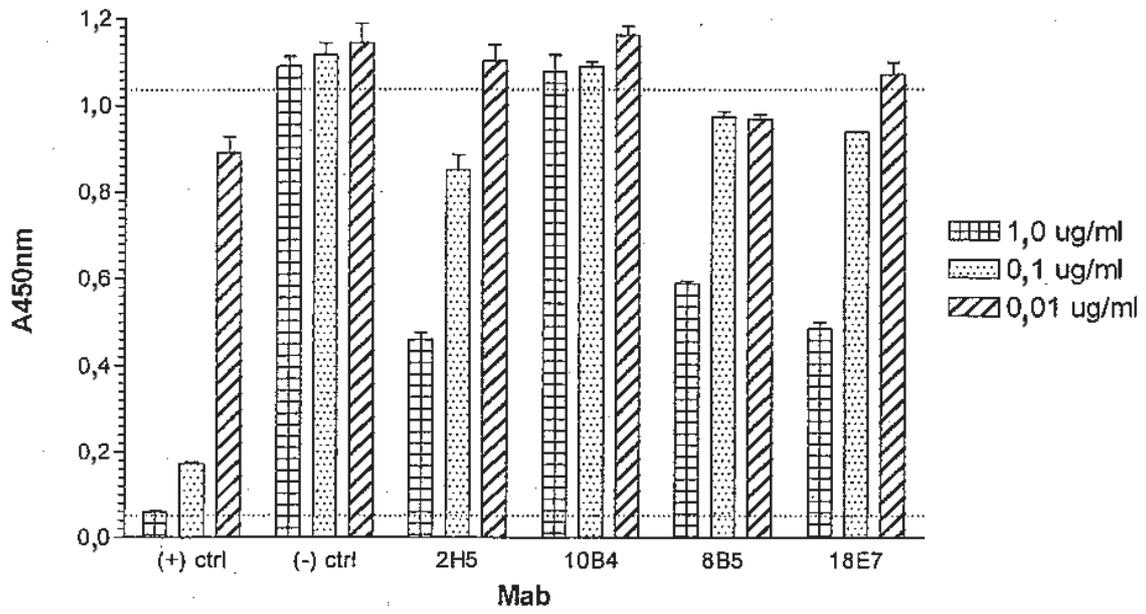


Figura 28

Estudio de eficacia de modelo de Raji

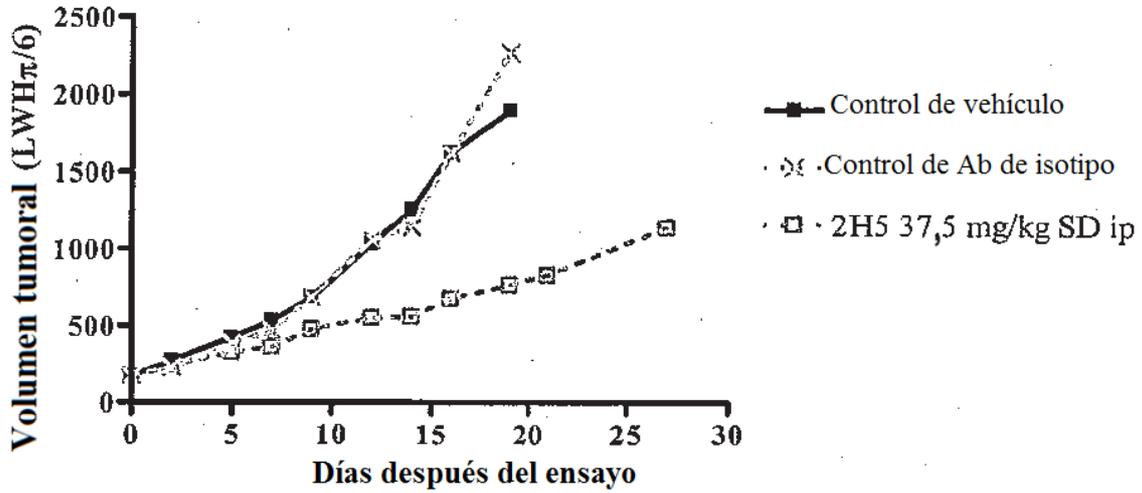


Figura 29A

Eficacia de dosis individual de anticuerpos desnudos en tumores ARH77

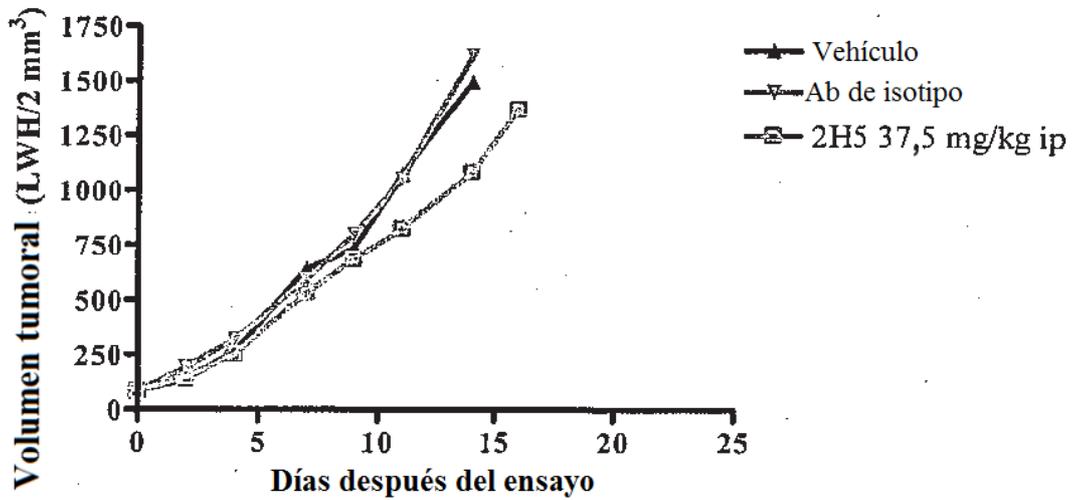


Figura 29B

Mediana del crecimiento tumoral de ARH-77

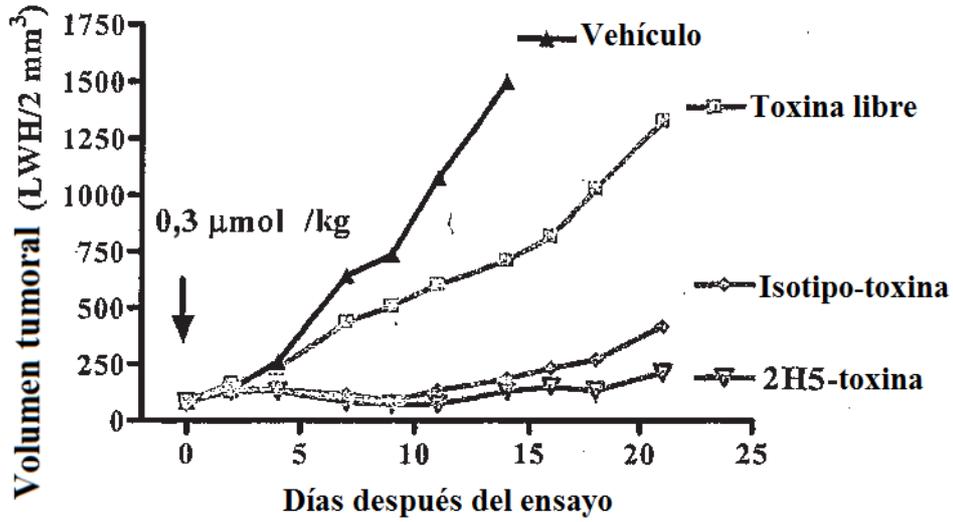


Figura 30A

Eficacia de conjugados de α CD70-toxina en tumores Granta 519

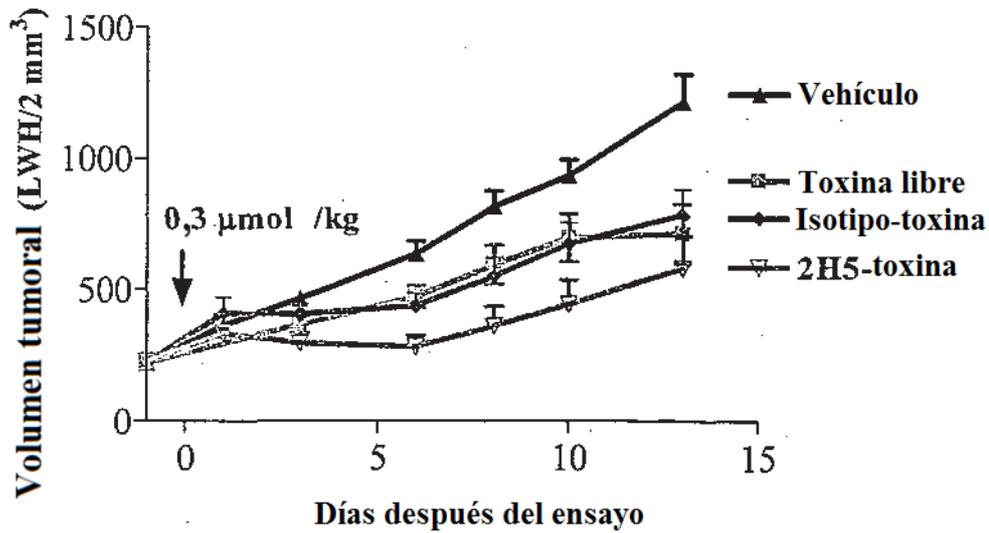


Figura 30B

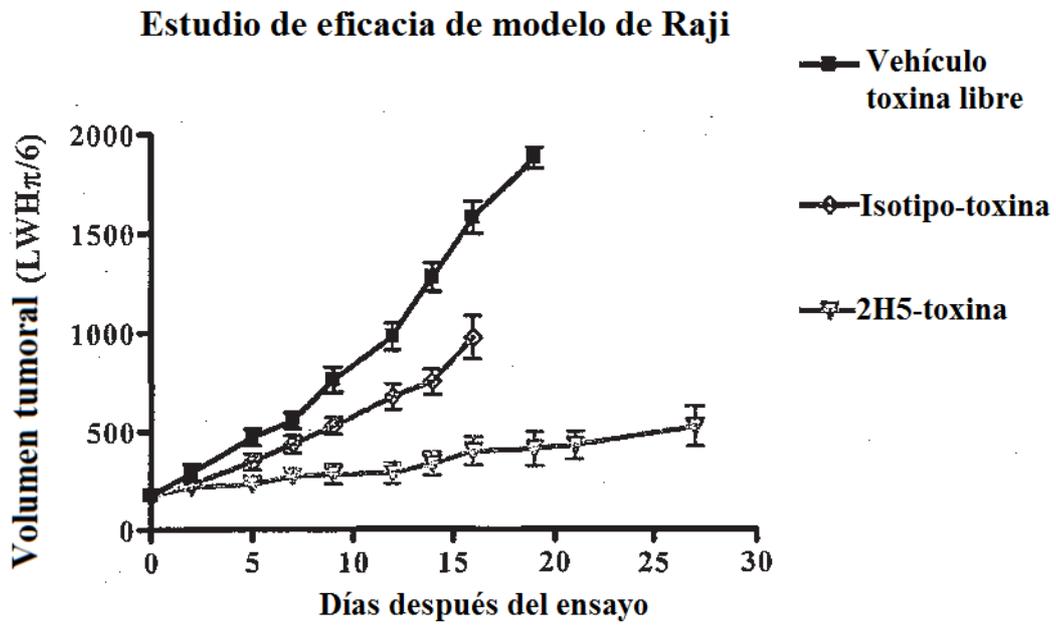


Figura 30C

69A7 reacciona de forma cruzada con la línea celular de linfoma de rhesus CD70+ (LCL)

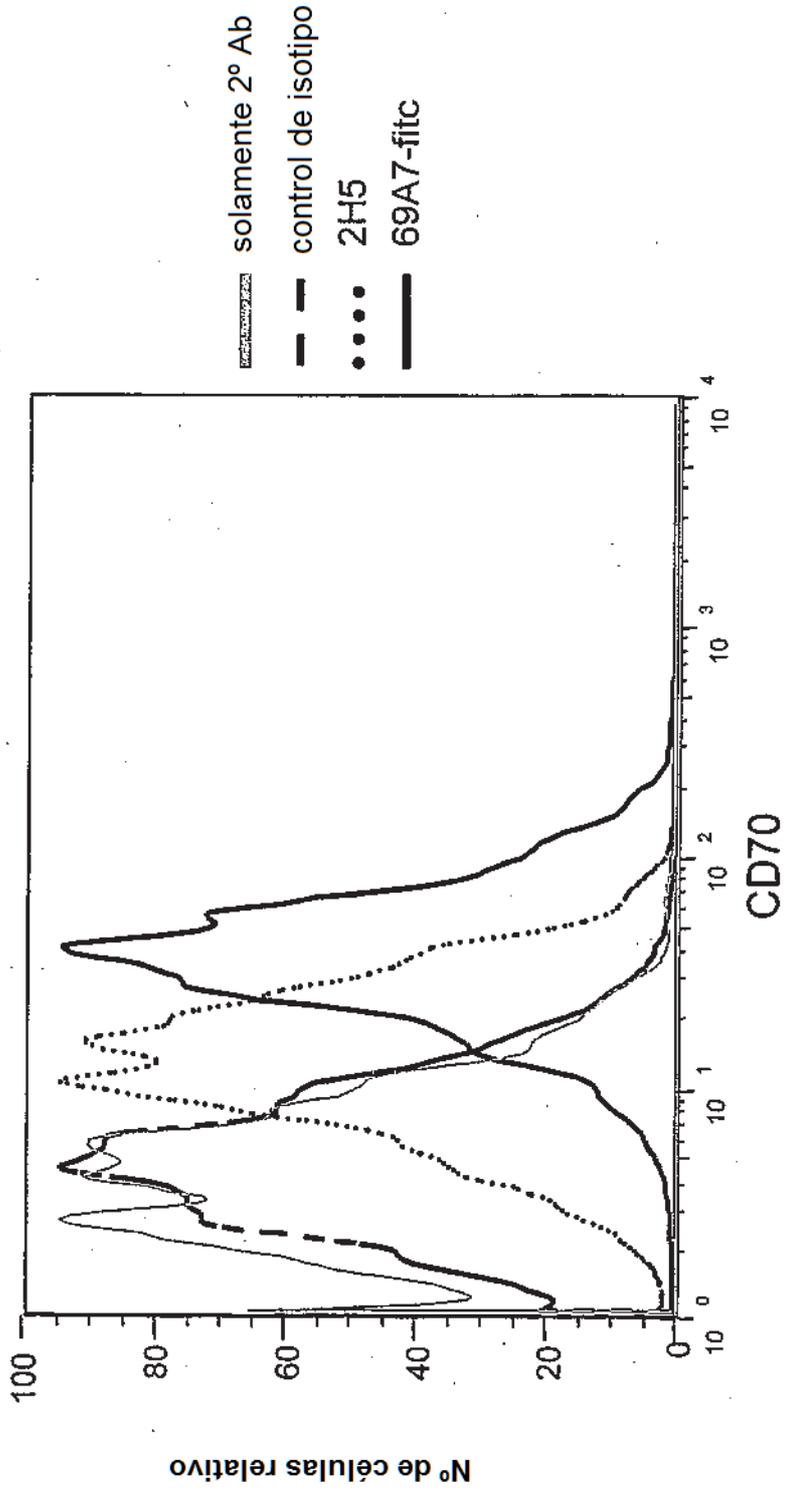


Figura 31

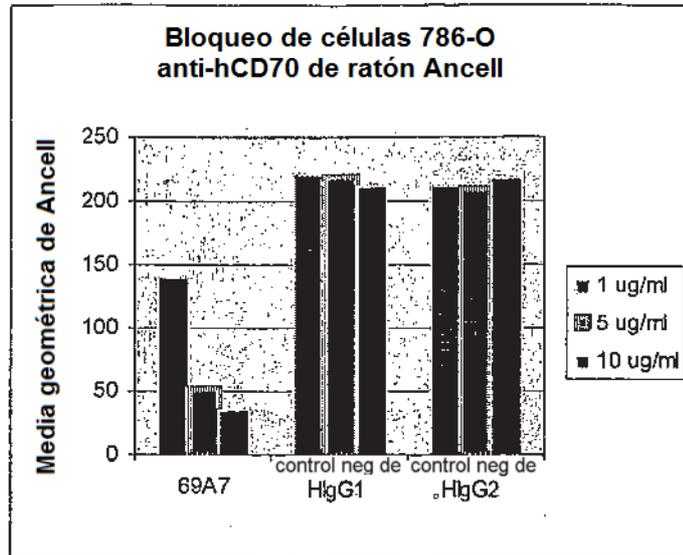


Figura 32

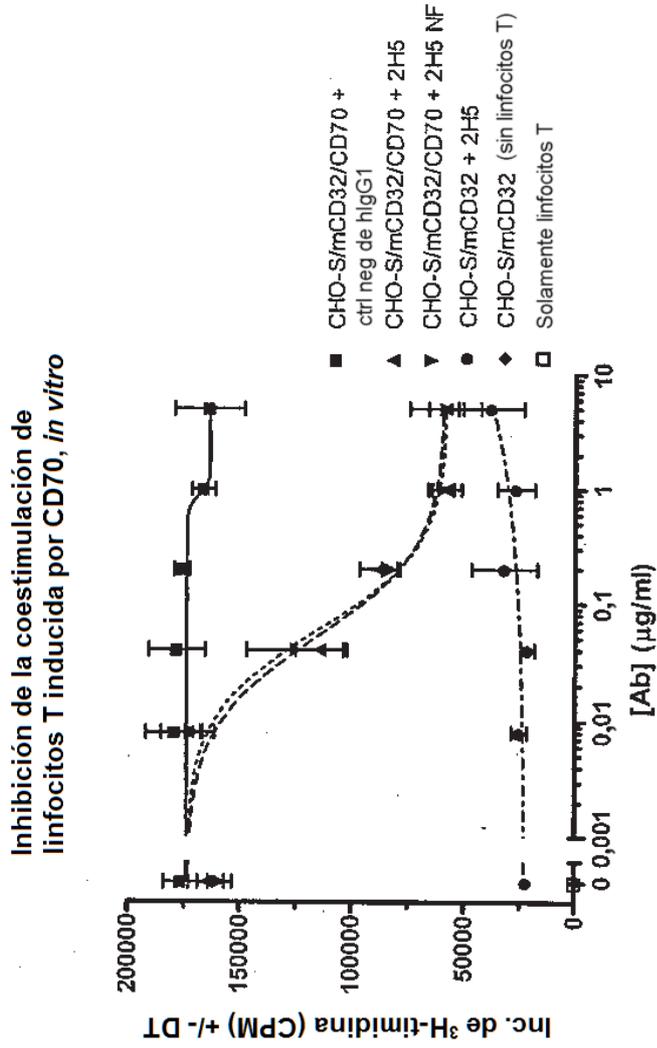


Figura 33A

Inhibición de secreción de INF- γ de linfocitos T inducida por CD70, *in vitro*

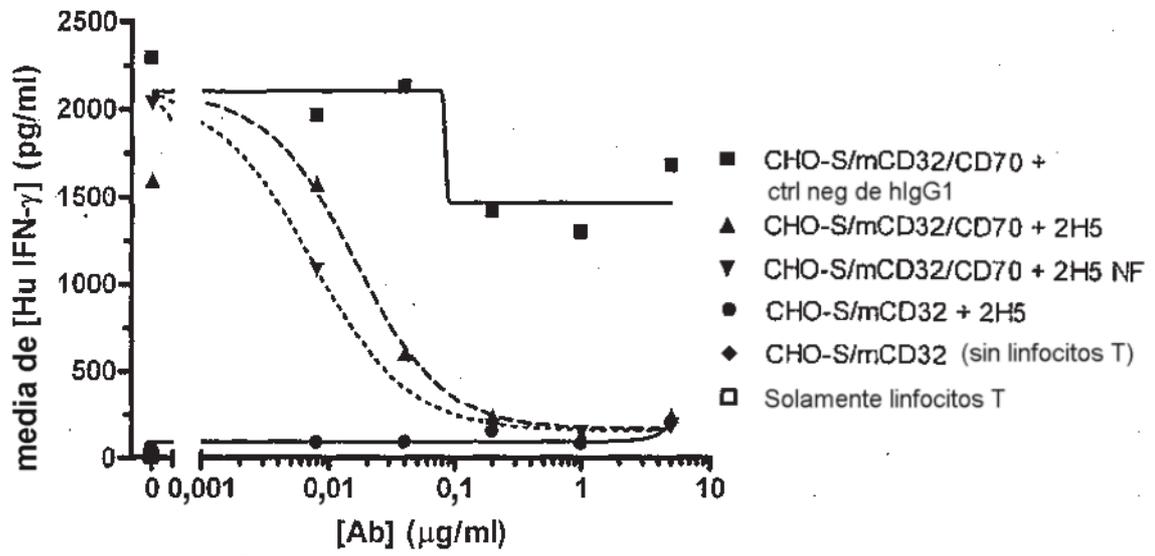


Figura 33B

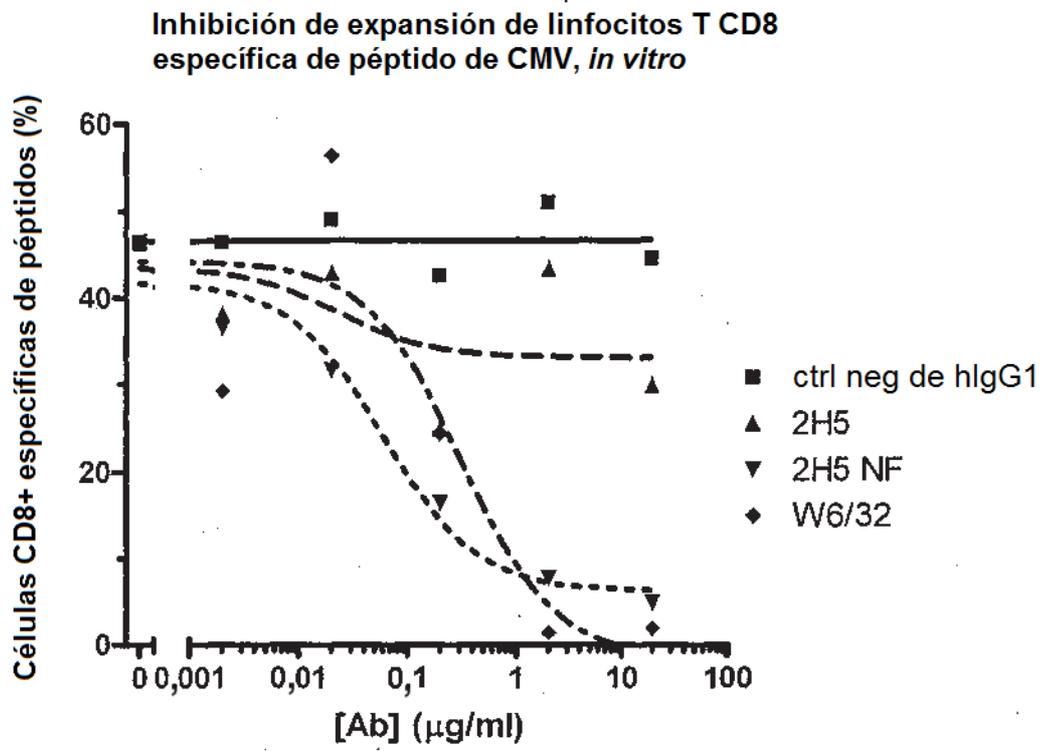


Figura 34A

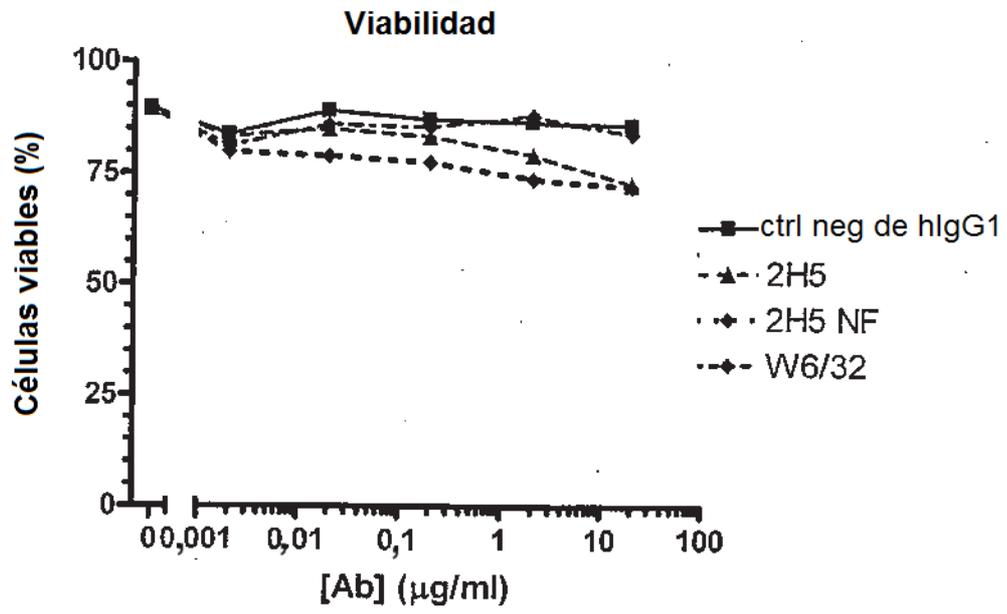


Figura 34B

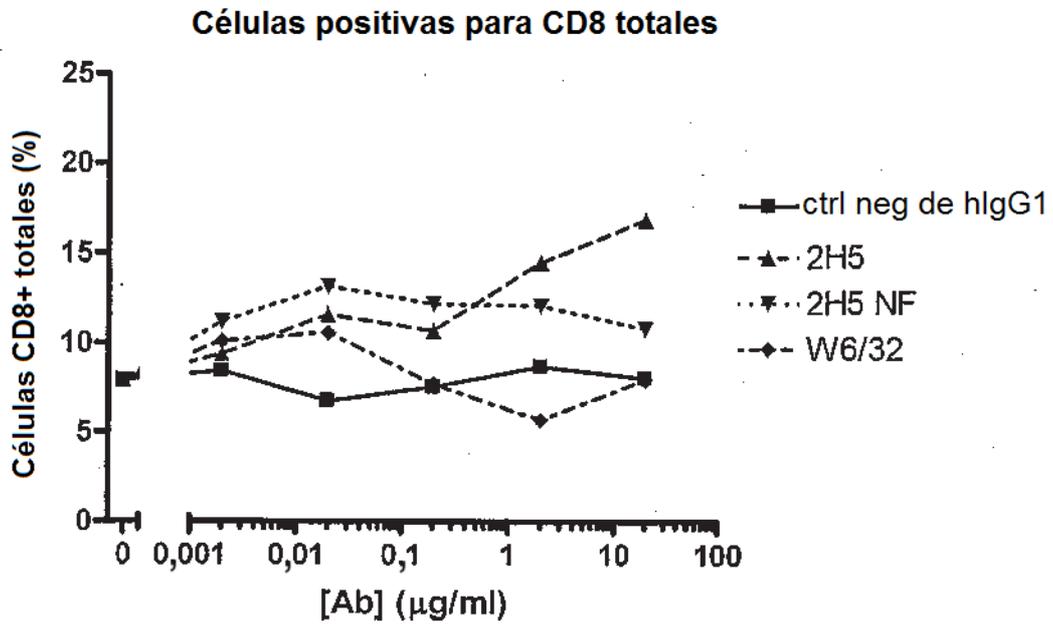


Figura 34C

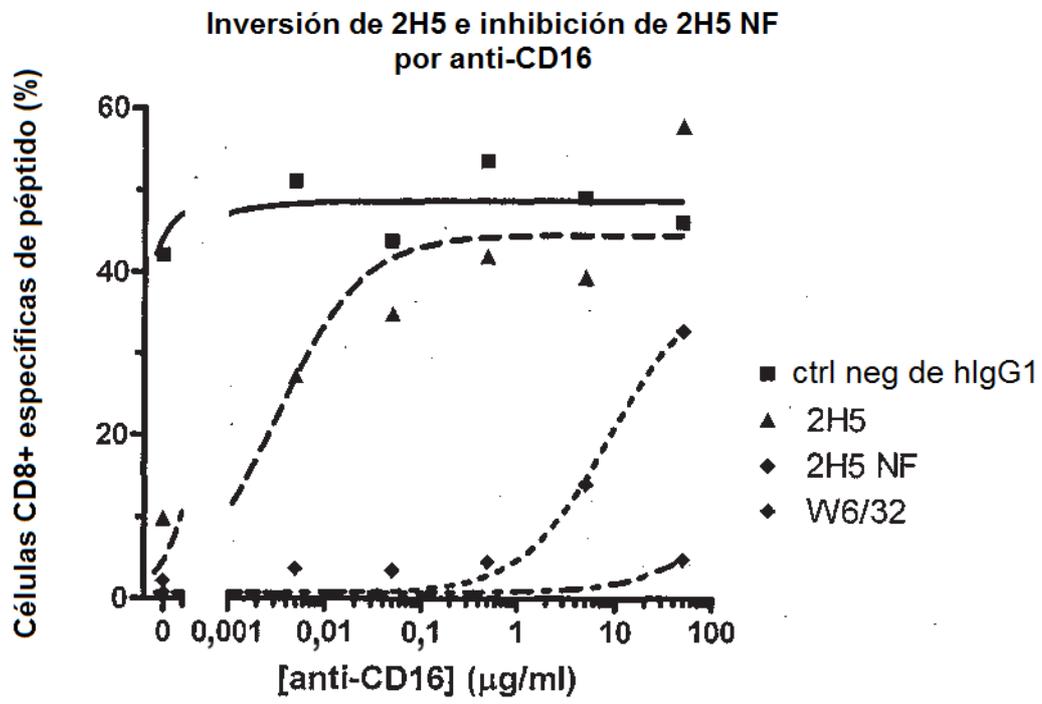


Figura 35

Mediana del volumen tumoral de 786-O 1115-022

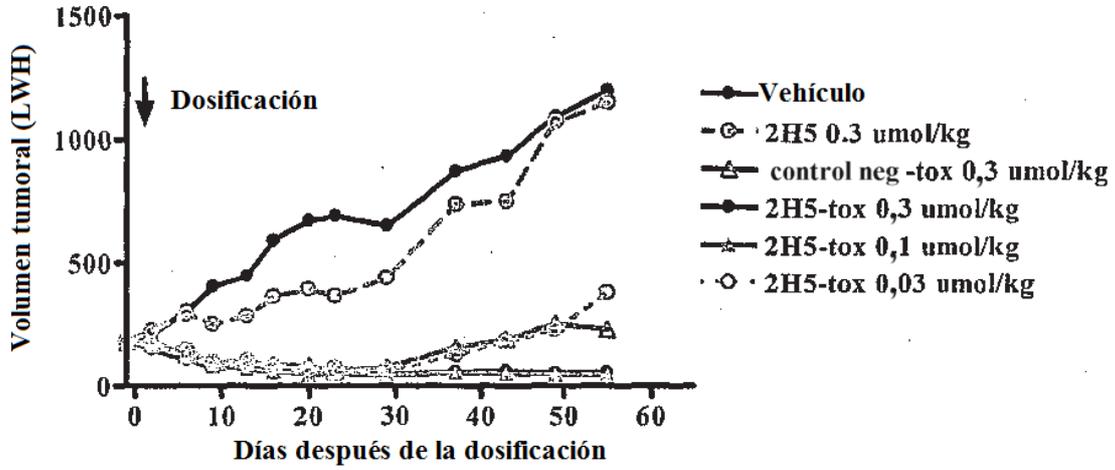


Figura 36A

Volumen tumoral medio Caki-1 1115-025

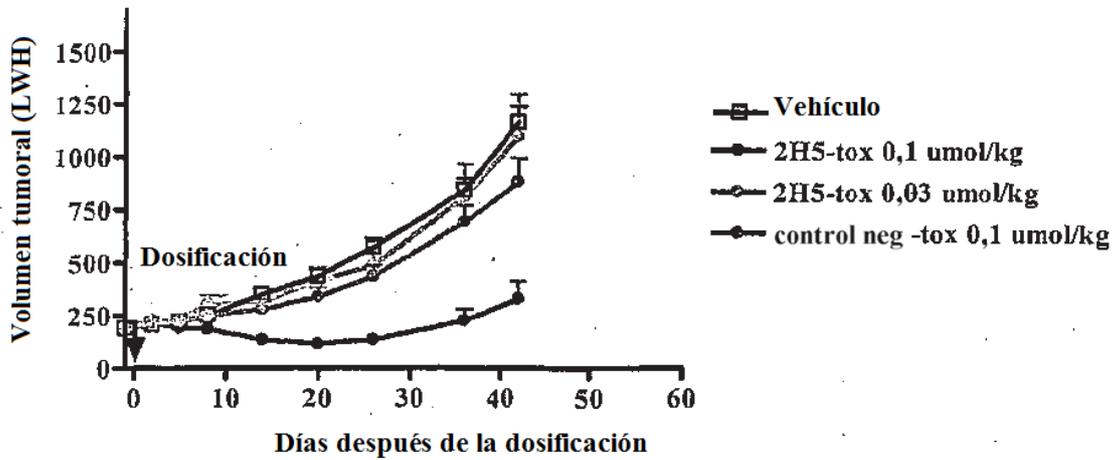


Figura 36B