(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 531 909**

(51) Int. CI.:

***A61K 39/395*** (2006.01)
***A61K 47/48*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
*C07K 16/30* (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2002 E 06014768 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1733736**

(54) Título: **Método de producción de anticuerpos recombinantes contra tumores**

(30) Prioridad:

**07.02.2001 US 266853 P**
**05.10.2001 US 327008 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**20.03.2015**

(73) Titular/es:

**WILEX AG (100.0%)**
**GRILLPARZERSTRASSE 10**
**81675 MÜNCHEN, DE**

(72) Inventor/es:

**OOSTERWIJK, EGBERT, DR.;**
**WARNAAR, SVEN, PROF. y**
**ULLRICH, STEFAN, DR.**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

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

Método de producción de anticuerpos recombinantes contra tumores

La invención se refiere a la célula de hibridoma G250 o cualquier célula de progenie de la misma capaz de producir el anticuerpo G250.

La fusión de células de mieloma de ratón con las células del bazo de ratones inmunizados, descrita por primera vez por Kohler y Milstein, Nature, 256, 495–997 (1975), hace posible obtener líneas continuas de células que producen anticuerpos homogéneos, a los que se hace referencia como anticuerpos monoclonales (mAb).

Existen muchos ejemplos en los que se describen células híbridas o hibridomas. Estos hibridomas se utilizan para producir anticuerpos útiles para diversas investigaciones científicas (Current Topics in Microbiology and Immunology, volumen 81 – "Lymphocyte Hybridomas", F. Melchers et al., Springer–Verlag (1978) y las referencias citadas en dicho lugar; C.J. Barnstable et al., Cell, (1978), 14, 9–20; P. Parham, W.F. Bodmer, Nature (1978), 276, 397–399; Handbook of Experimental Immunology, 3ª edición, vol. 2, D.M. Wier, editor, Blackwell, 1978, capítulo 25, Chem. Eng. News, 15–17 (1979); Kennett, R.H., McKearn, J.T. y Bechtol, K.B. (1980) Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis (Plenum, Nueva York)). Estos informes describen las técnicas principales para la producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas.

El anticuerpo monoclonal G250, subclase IgG1, reconoce un antígeno expresado preferentemente en las membranas de las células de carcinoma de células renales (RCC) que no se expresa en el epitelio tubular proximal normal. El anticuerpo G250 se obtuvo por inmunización de un ratón con homogeneizados de células procedentes de lesiones RCC primarias obtenidas de diferentes pacientes (Oosterwijk et al., Int. J. Cancer 38 (1986), 489–494).

El anticuerpo monoclonal G250 así como derivados quiméricos del mismo se han utilizado en estudios clínicos (Steffens et al., J. Clin. Oncol. 15 (1997), 1529–1537; Steffens et al., Clinical Cancer Research 5 (1999), 32681-32741). La secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de fijación de antígeno de G250 es el asunto de la solicitud US también en tramitación No. 60/266853, que se incorpora en esta memoria por referencia.

La producción de una línea de células de hibridoma que expresa el anticuerpo G250 se describió en líneas generales en la solicitud de patente internacional WO88/08854 y Oosterwijk et al., (supra). Como se ha indicado anteriormente, se utilizó como inmunógeno un homogeneizado de células procedente de lesiones RCC primarias obtenidas de diferentes pacientes y por tanto un material inespecífico. Adicionalmente, la línea de células de hibridoma no había sido depositada en una institución depositaria reconocida de acuerdo con el Tratado de Budapest. Así pues, no parece que sea posible una reproducción exacta de la línea de células de hibridoma G250 a partir de los documentos de la técnica anterior disponibles públicamente.

Entretanto, se ha encontrado que el anticuerpo G250 se fija al denominado antígeno MN que se describe, v.g., en WO93/18152. Sin embargo, el sitio de fijación de G250 en el antígeno MN no se conoce actualmente. Además, resultados recientes demuestran que el sitio de fijación de G250 es un epítopo de conformación, lo cual aumenta adicionalmente la dificultad para reproducir la línea de células de hibridoma G250, dado que no puede proporcionarse ninguna secuencia epitópica especificada en el antígeno MN que se fije a G250.

Así, la presente invención se refiere a una célula de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal G250. Esta célula de hibridoma fue depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos en fecha 11 de septiembre de 2001 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, bajo el Número de Acceso DSM ACC 2526. El depósito es la primera descripción públicamente disponible de una línea de células de hibridoma productora del anticuerpo G250.

Un aspecto adicional de la invención es una célula de progenie derivada de dicho hibridoma DSM ACC 2526 que produce un anticuerpo G250.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una célula de progenie de la célula de hibridoma depositada que produce un anticuerpo G250 en donde la célula de progenie se obtiene por métodos de DNA recombinante, v.g., por transferencia de material genético que codifica el anticuerpo G250 o al menos el sitio de fijación de antígeno del mismo a una célula receptora. El material genético puede obtenerse directa o indirectamente de la célula de hibridoma G250 depositada. "Obtenido directamente" significa que el material genético G250 se deriva de la célula de hibridoma depositada. "Obtenido indirectamente" significa que el material genético G250 se deriva de una célula de progenie G250 ya existente o de otras fuentes con inclusión de la síntesis química.

Preferiblemente, el material genético G250 comprende secuencias de nucleótidos que codifican al menos el sitio de fijación de antígeno de G250, particularmente secuencias de nucleótidos que codifican las regiones determinantes complementarias CDR3, CDR2 y/o CDR1 del sitio de fijación de antígeno de la cadena pesada como se muestra en la Figura 1 (designado H1–H3) y/o las regiones determinantes complementarias CDR3, CDR2 y/o CDR1 del sitio de sitio de fijación de antígeno de la cadena ligera (designado L1–L3) como se muestra en la Figura 1.

De acuerdo con la invención, el término "anticuerpo G250" abarca cualquier anticuerpo con inclusión de anticuerpos multiespecíficos (v.g. anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo con tal que los mismos exhiban la actividad deseada, es decir, al menos un sitio de fijación de antígeno de G250. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM, IgG (v.g. $IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$ o $IgG_4$), IgD, IgA o IgE, particularmente un anticuerpo IgG, un anticuerpo recombinante o un fragmento de anticuerpo obtenido por métodos proteolíticos o por métodos de DNA recombinante.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones existentes naturalmente que pueden estar presentes en cantidades relativamente pequeñas.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a cualquier polipéptido que contenga al menos un sitio de fijación de antígeno de G250, es decir al menos la región CDR3 de la cadena pesada de G250 y/o la región CDR3 de la cadena ligera de G250 o una región variante CDR3 de G250 que tiene una identidad de al menos 80%, con preferencia al menos 90% con la región CDR3 de G250 original al nivel de aminoácidos, con la condición de que la región variante CDR3 tiene características de fijación de antígeno equivalentes, particularmente afinidad y especificidad comparadas con la región CDR3 original.

Preferiblemente, el término "anticuerpo" empleado en esta memoria incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y totalmente humanizados, anticuerpos monocatenarios, v.g. fragmentos de anticuerpo sFv, fragmentos de diacuerpos, fragmentos de anticuerpos proteolíticos o recombinantes tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' o $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de anticuerpos fijadores de antígeno. El anticuerpo puede ser también una fusión o un conjugado con otras entidades.

Los anticuerpos de esta memoria incluyen específicamente anticuerpos quiméricos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera que incluye el sitio de fijación de antígeno es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes derivadas de la línea de células de hibridoma G250 original, mientras que el resto de las cadenas es idéntico u homogéneo a secuencias correspondientes derivadas de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos con tal que los mismos exhiban la actividad biológica deseada. Más preferiblemente, el anticuerpo quimérico comprende regiones variables, v.g. las regiones determinantes del complemento (CDRs) y las regiones marco de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal G250 original y secuencias humanas constantes, particularmente secuencias humanas constantes de cadena ligera kappa y cadena pesada gamma. La fabricación de anticuerpos quiméricos ha sido descrita v.g. por Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 6851–6855), que se incorpora en esta memoria por referencia.

Adicionalmente, el término anticuerpo incluye específicamente en esta memoria anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos. Los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. De modo más particular, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales residuos de una CDR de un anticuerpo humano dado están reemplazados por residuos de la CDR de G250, particularmente la región CDR1, 2 y/o 3 de la cadena pesada y/o ligera. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor humano ni en las secuencias CDR de G250 importadas. Estas modificaciones se realizan para afinar y optimizar ulteriormente la eficiencia del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado o totalmente humano comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos 1, y típicamente 2, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de la inmunoglobulina de G250 original y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones marco y regiones constantes son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. La fabricación de anticuerpos humanizados ha sido descrita, v.g. en Jones et al. (Nature 321 (1986), 522–525), Riechmann et al. (Nature 332 (1988), 323–329 y Presta (Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992), 332–339), que se incorporan en esta memoria por referencia.

Adicionalmente, los anticuerpos incluyen específicamente anticuerpos monocatenarios tales como fragmentos de anticuerpo monocatenarios Fv que comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para fijación del antígeno. La fabricación de anticuerpos sFv ha sido descrita v.g. por Plückthun en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg y Moore, editores, Springer Verlag, NY, pp. 269–315 (1994), Barbas III (Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119) y Hoogenboom et al. (Immunol. Rev. 130 (1992), 41–68), que se incorporan en esta memoria por referencia.

Adicionalmente, los anticuerpos incluyen de modo específico diacuerpos, es decir pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de fijación de antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada conectado a un dominio variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica. Por la utilización de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de

fijación de antígeno. La fabricación de diacuerpos ha sido descrita v.g. por Hollinger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444–6448), que se incorpora en esta memoria por referencia.

Adicionalmente, los anticuerpos incluyen específicamente anticuerpos multiespecíficos, v.g. anticuerpos heterobiespecíficos que comprenden al menos un sitio de fijación de antígeno de G250 y el sitio de fijación de antígeno de un anticuerpo diferente, v.g. un anticuerpo anti–CD3.

El anticuerpo producido por la célula de hibridoma G250 o una célula de la progenie de la misma puede fusionarse o acoplarse a un componente marcador o efector. Por ejemplo, el anticuerpo G250 puede modificarse recombinantemente de tal manera que el mismo se enlaza a citocinas tales como la interleucina–2 (IL–2), el factor de necrosis tumoral (TNF) y/o el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM–CSF).

Adicionalmente, el anticuerpo G250 puede estar conjugado, v.g. por acoplamiento covalente o fusionado a un grupo marcador adecuado, v.g. un grupo fluorescente, un grupo marcador radiactivo, etc. o un agente citotóxico con inclusión de isótopos radiactivos tales como I, Y, Pr, Tm, In, tales como $^{123}$I, $^{125}$I, $^{135}$I, $^{99m}$Tm o $^{111}$In, agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

La célula receptora a la cual se transfiere el material genético específico de G250 procedente de la célula de hibridoma G250 original o cualquier progenie de la misma, o de origen sintético, puede ser cualquier célula hospedadora adecuada capaz de expresar anticuerpos. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula procariota, preferiblemente una célula de E. coli, o una célula eucariota. Células eucariotas preferidas son, v.g. células de insecto, de levadura y de mamífero. Células hospedadoras muy preferidas son células de mamífero, v.g. células de mieloma humano o de ratón, o células CHO.

Adicionalmente, la presente invención comprende un método de producción del anticuerpo G250 o derivados del mismo, que comprende:

cultivar una célula de hibridoma G250 o una célula de la progenie de la misma en condiciones adecuadas, en donde se produce un anticuerpo G250 y obtener el anticuerpo y/o derivado del mismo a partir de la célula y/o del medio de cultivo de la célula.

El anticuerpo obtenido de acuerdo con este método es particularmente útil para producir formulaciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo como agente activo, además de portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

En una realización especialmente preferida, el agente activo es un anticuerpo G250 quimérico que puede estar presente como tal o como un conjugado con un grupo radiactivo, v.g. con $^{123}$I, $^{125}$I, $^{131}$I, $^{99m}$Tm o $^{111}$In.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de la célula de hibridoma depositada y células de progenie de la misma para fabricar anticuerpos G250 como se ha descrito arriba, v.g. anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanizados, anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos $(Fab')_2$, Fab', Fab y Fv.

El anticuerpo quimérico G250 ha sido utilizado con éxito en estudios clínicos para el tratamiento de pacientes de carcinoma de células renales después de la cirugía. Aun cuando el estudio no se ha completado todavía, los pacientes tratados exhiben ya un aumento importante en la supervivencia mediana (más de 15 meses) en comparación con los pacientes sin tratar (tres meses) o pacientes tratados con terapia estándar (10–12 meses).

Sorprendentemente, se ha encontrado que en algunos casos ocurría regresión del tumor más de seis meses después del comienzo de la terapia. Así pues, el anticuerpo G250 quimérico y otros anticuerpos G250 son capaces de provocar una respuesta inmunitaria retardada en la terapia del cáncer, preferiblemente en el tratamiento del carcinoma de células renales y más preferiblemente para el tratamiento de las metástasis después de cirugía tumoral.

Ejemplo 1

Depósito de la línea de células de hibridoma G250

Se produjo la línea de células de hibridoma G250 como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO88/08854. En dicho documento se proporciona un protocolo de inmunización general. No se ofrecen informaciones adicionales, v.g. una caracterización molecular del anticuerpo G250 y la línea de células de hibridoma.

La línea de células de hibridoma G250 se depositó de acuerdo con los requerimientos del Tratado de Budapest en DSMZ bajo el No. de Acceso DSM ACC 2526 en fecha 11 de septiembre de 2001.

Ejemplo 2

Mapeado del epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal G250

Por la evidencia experimental colectiva se supone que el epítopo proteínico de G250 reconocido por el anticuerpo monoclonal G250 (MAbG250) es estructural, más probablemente de naturaleza no lineal. Esta suposición está basada en las observaciones siguientes:

– MabG250 no reacciona con el antígeno G250 en el análisis de transferencia Western.

– La purificación del antígeno G250 por cromatografía de afinidad de MAbG250 es muy ineficiente, disminuyendo las eficiencias con el aumento del tiempo necesario para realizar la purificación, lo que sugiere una degradación/despliegue rápidos del epítopo G250, a pesar de las condiciones óptimas para impedir la proteólisis.

– La adición de detergentes en general conduce a una disminución de los niveles de detección de G250 en ELISA.

– La truncación del cDNA codificante del antígeno G250, seguida por transfección transitoria en las células negativas para G250, seguida por análisis inmunohistoquímico reveló:

| Constructo de cDNA | Reactividad con G250 |
|---|---|
| nt 1–1500 (aa 1–459), proteína completa | + |
| nt 1–1218 (aa 1–406), G250 sin región transmembranal | +/– |
| nt 1–1074 (aa 1–358) | – |
| nt 1–843 (aa 1–281) | – |
| nt 1–672 (aa 1–224) | – |
| nt 1–450 (aa 1–150) | – |

Se encontró que la reactividad con G250 se perdía, aun cuando se utilizaron constructos de cDNA grandes.

Para delinear ulteriormente el epítopo de G250, se utilizó el sistema NovaTope (Novagen Inc.), sistema que asegura la expresión de todos los constructos ligados a este vector, es decir, que se expresan todos los fragmentos posibles, con indiferencia del marco de lectura. Esto permite la identificación de los epítopos presentes en la parte central de una proteína.

El cDNA codificante del antígeno MN (G250) se digirió con DNAsa I durante 2 horas, dando como resultado fragmentos de aproximadamente 50–200 nucleótidos que codificaban polipéptidos que tenían una longitud de aproximadamente 15–70 aminoácidos. Después de la adición de colas dA, los fragmentos se insertaron en el vector pScreen T, y la mezcla de ligación se añadió a bacterias E. coli DE3 competentes para transformación. Las bacterias se extendieron en placas de selección. Los clones bacterianos se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se cribaron con el anticuerpo G250. En total se identificaron 7 colonias con MAbG250. La reactividad de G250 era débil. Después de re–cribado adicional, apareció un solo clon bacteriano que reaccionaba con MAbG250, aunque de modo extraordinariamente débil, y debido muy probablemente a tinción de fondo. El análisis de la secuencia del clon no revelaba secuencia alguna de G250, pero demostraba la presencia de un vector truncado. Así pues, la tinción de la transferencia de nitrocelulosa era muy probablemente el resultado de un ruido de fondo inespecífico.

En un experimento adicional, cDNA que codificaba el antígeno MN (G250) se digirió con DNAsa I, pero esta vez se aislaron fragmentos de 200–600 nucleótidos, que codificaban polipéptidos de aproximadamente 65–200 aminoácidos, se clonaron en el vector de expresión y se expresaron en bacterias. Las colonias bacterianas separadas se cribaron respecto a reactividad con G250.

La reactividad con G250 no era clara. Las transferencias se tiñeron durante periodos prolongados, después de lo cual se observó una tinción débil con 6 aislados bacterianos. Los aislados bacterianos contenían sólo un vector truncado y una secuencia no afín.

Así pues, no pudo identificarse secuencia parcial alguna del antígeno MN que tuviera reactividad fuerte con MAbG250.

Estos resultados sugieren claramente que el epítopo G250 es un epítopo estructural. Adicionalmente, el epítopo G250 en el antígeno MN no puede caracterizarse por métodos convencionales incluso con esfuerzos considerables.

Ejemplo 3

Desarrollo de una línea de células quimérica productora de IgG de G250

Estrategia general

Para construir una versión quimérica ratón/humana del anticuerpo murino G250, los genes de la región variable para las cadenas pesada y ligera, que determinan la especificidad de fijación del anticuerpo, se clonaron a partir del hibridoma murino G250 y se ensamblaron in vitro con genes de región constante humana para generar genes de anticuerpos quiméricos ratón/humano. La expresión de estos genes quiméricos en la línea de células apropiada dio como resultado la producción de un anticuerpo quimérico con las mismas características de fijación que el anticuerpo murino original, pero cuya molécula contenía aproximadamente 75% de secuencias humanas.

La estrategia para la clonación de las regiones variables para los genes de cadena pesada y ligera del hibridoma G250 se basó en el enlace en el genoma entre la región variable y la región J (de unión) correspondiente para genes de inmunoglobulina reordenados (y expresados) funcionalmente. Pueden utilizarse sondas de DNA de la región J para cribar genotecas genómicas a fin de aislar DNA enlazado a las regiones J; el DNA en la configuración de la línea germinal (no reordenado) podría hibridarse también a sondas J, pero no está enlazado a una secuencia de región variable y puede identificarse por análisis con enzimas de restricción de los clones aislados.

Por esta razón, la estrategia de clonación consistió en aislar regiones variables a partir de genes de cadena pesada y ligera reordenados utilizando sondas JH y JK. Adicionalmente, para contribuir a la identificación y caracterización de los clones genómicos correctos, se obtuvieron también clones de cDNA correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada y ligera a partir del mRNA producido en el hibridoma G250. Aquellos clones genómicos que coincidían con las secuencias de cDNA de G250 se clonaron en vectores de expresión que contenían regiones constantes humanas y se transfectaron en células de mieloma de ratón para determinar si se producía un anticuerpo. El anticuerpo procedente de las células productoras se ensayó luego respecto a especificidad de fijación comparándolo con el anticuerpo G250 murino.

Clonación de cDNA de VH y VL de G250

Se aisló el RNA total de la célula de hibridoma G250 y se utilizó para generar clones de cDNA específicos de VH y VL. La síntesis de cDNA de la primera cadena se realizó utilizando cebadores oligonucleotídicos específicos para las regiones constantes kappa e IgG murinas. Después de la adición de colas dG, se realizó la síntesis de la segunda cadena utilizando cebadores oligonucleotídicos provistos de colas C. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos 5' y 3', y los productos de amplificación se clonaron en el vector de plásmido pUC19. Los clones VH y VL se sometieron a análisis de la secuencia de DNA para establecer las secuencias de bases de las regiones variables supuestas de cadena pesada y ligera de G250. Los resultados de la secuenciación se muestran en Fig. 1.

Clonación de los Genes de la Región Variable de G250

Para clonar los genes de la región variable, se aisló DNA genómico de peso molecular alto a partir de células de hibridoma G250 por tratamiento de núcleos aislados con SDS y proteinasa K seguido por dos extracciones con fenol y una precipitación con etanol.

El análisis por transferencia Southern utilizando una sonda de la región J para el locus de la cadena pesada sugería que la cadena pesada de G250 estaba contenida en un fragmento de DNA EcoRI de 2,3 kilobases (Kb). De acuerdo con ello, los fragmentos EcoRI procedentes del DNA del hibridoma se fraccionaron en un gel de agarosa al 0,8% y el intervalo de tamaños de fragmentos de aproximadamente 2–3 Kb se eluyó del gel y se ligó a las ramas vectoras del vector Zap II del bacteriófago lambda (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). La ligación se empaquetó en partículas de fago in vitro utilizando Gigapack Gold (Stratagene) y se extendió en placas en células LE392 de E. coli a una densidad de aproximadamente 20.000 calvas por placa de 150 mm. Las calvas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se sondaron con una sonda de DNA marcada con $^{32}P$ (un fragmento EcoRI–BamHI de 2,0 Kb que contenía los exones murinos J3 y J4).

Para el gen de la región variable de la cadena ligera de G250, un análisis por transferencia Southern utilizando una sonda de la región J murina del locus kappa indicaba que el gen correcto estaba localizado en un fragmento HindIII de 5,5 Kb. De acuerdo con ello, se digirió el DNA del hibridoma G250 con HindIII y se aislaron fragmentos de DNA de 5-6 Kb a partir de un gel de agarosa al 0,8% y se ligaron a las ramas del vector Charon 27 del bacteriófago lambda. El DNA ligado se empaquetó en partículas de fago in vitro utilizando Gigapack Gold (Stratagene), y se extendió en placas sobre células LE392 de E. coli a una densidad de aproximadamente 20.000 calvas por placa de 150 mm. Las calvas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se sondaron con una sonda de DNA marcada con $^{32}P$ (un fragmento HindIII de 2,7 Kb que contenía la totalidad de los cinco exones kappa J).

Los clones positivos para los genes de las cadenas pesada y ligera se aislaron después de al menos 3 tandas de purificación de calvas utilizando las sondas de la región J para comprobar la hibridación al DNA de fago en cada etapa de purificación. El DNA purificado a partir de los clones de fago aislados para los genes pesados y ligeros se

digirió con EcoRI (cadena pesada) o HindIII (cadena ligera) y se fraccionó en geles de agarosa. Los fragmentos de tamaño apropiado (2,3 Kb para la cadena pesada y 5,5 kb para la cadena ligera) se aislaron de los geles, y se subclonaron en el vector de plásmido pUC19. Por mapeado con endonucleasas de restricción y análisis de la secuencia de DNA se demostró que estos fragmentos de DNA subclonados contenían genes de anticuerpos de la región variable que coincidían con las estructuras de los clones de cDNA obtenidos originalmente a partir del hibridoma G205.

Plásmidos de Expresión

El fragmento de la región variable de la cadena pesada de 2,3 Kb EcoRI se clonó en un vector de expresión adecuado que contiene la región constante G1 humana y un gen que confiere resistencia a un marcador seleccionable en células de mamífero. El fragmento de la cadena ligera de 5,5 Kb HindIII se clonó en un vector de expresión adecuado que contiene la región constante kappa humana y un gen que confiere resistencia a un marcador seleccionable en células de mamífero. La presencia de los fragmentos clonados y su orientación en los vectores de expresión se determinó por mapeado con enzimas de restricción. Los vectores básicos han sido utilizados previamente para la construcción de anticuerpos quiméricos (Sun, L. et al., (1987) PNAS 84, p. 214; Knight et al., (1993), Molecular Immunology 30, p. 1443–1453). La expresión de los genes de anticuerpos quiméricos se consigue utilizando los promotores de inmunoglobulina naturales presentes aguas arriba de las regiones variables clonadas; las señales reguladoras aguas abajo son proporcionadas por los elementos asociados con los genes de la región constante.

Expresión del Anticuerpo Quimérico G250

Los vectores de expresión de las cadenas pesada y ligera se utilizaron para co–transfectar una línea de células de mieloma de ratón no productora utilizando la técnica de electroporación. Se utilizó un ensayo ELISA para cribar clones para el anticuerpo secretado que contenían una región Fc humana, y se seleccionó el productor mayor (cG250) para caracterización ulterior.

El antígeno quimérico se purificó por cromatografía sobre proteína A–Sepharosa, y se analizó en un ensayo de competición para comprobar que el anticuerpo tiene la especificidad correcta. Se encontró que el anticuerpo cG250 era tan eficaz en la competición con G250 murino marcado con $^{125}$I para fijación a las células de carcinoma de células renales A704 (que expresan el antígeno G250) como el anticuerpo G250 murino sin marcar. Por consiguiente, el anticuerpo quimérico G250 es similar en sus características de fijación al anticuerpo G250 murino original.

Ejemplo 4

Uso del anticuerpo quimérico G250 en un estudio clínico

Protocolo de administración

Pacientes de carcinoma de células renales, que presentaban metástasis después de la cirugía, se trataron por administración de 50 mg del anticuerpo quimérico G250 por infusión durante 30 min una sola vez por semana durante 12 semanas.

Conclusiones de eficacia:

En el presente estudio, se consiguió una enfermedad estable duradera durante más de seis meses en ocho de 32 pacientes (25% de los pacientes). El tiempo mediano hasta la progresión para todos los pacientes era de 16 semanas (valor medio 26,67 semanas) con un intervalo de 4 a 70 semanas. En diciembre de 2001, la fecha de interrupción, cinco pacientes están todavía exentos de progresión (51+, 56+, 60+, 64+ y 70+ semanas).

La importancia de estos descubrimientos se ve respaldada por el hecho de que la mayoría de dichos pacientes padecían enfermedad progresiva documentada, suponiéndose que otros dos pacientes se encontraban en fase de progresión en el momento de su incorporación en el estudio. Adicionalmente, tres de estos pacientes eran refractarios a la terapia previa con citocina y quimioterapia o habían sufrido recidiva varios años después del tratamiento con citocina. Cuatro pacientes no se habían sometido a terapia previa y se trataron con el fármaco de estudio inmediatamente después del diagnóstico de las metástasis. En la fecha de su incorporación en el estudio, tres de estos pacientes tenían una estatus de nivel funcional de Karnofsky (KPS) de 80%, dos un KPS de 90%). La hemoglobina (Hgb) era inferior a 10 g/dl en 5 pacientes. El estatus mediano de nivel funcional de 90% (valor medio 91%) es idéntico para el grupo de pacientes que no han respondido. La Hgb mediana de 9,8 g/dl (valor medio 10,97 g/dl) es también relativamente baja.

Un paciente alcanzó una remisión objetiva completa. La respuesta objetiva ocurrió tarde, más de seis meses después del comienzo de la terapia del estudio. Otro paciente experimentó una reducción relevante de 59% en el tamaño de sus lesiones diana. La respuesta de ambos pacientes continúa en las semanas 64 y 70, respectivamente, con arreglo a la evaluación efectuada en diciembre de 2001. La regresión del tumor ocurrió tarde, más de seis meses después del comienzo de la terapia del estudio. Una explicación de la respuesta tardía puede ser que la

duración del tratamiento con inyecciones intravenosas del anticuerpo quimérico era relativamente corta y se desarrolló una respuesta inmune retardada no relacionada con ADCC.

La respuesta es duradera al cabo de más de un año y continúa todavía en diciembre de 2001. La tasa global de beneficio clínico (al menos más de seis meses o respuesta objetiva) es 25%. Adicionalmente, debería indicarse que a los seis meses después del comienzo del tratamiento de estudio, el 87,5% (28/32) de los pacientes estaban vivos todavía.

A finales de noviembre de 2001, se calculó que una estimación de la supervivencia mediana era al menos 13,5 meses.

A finales de enero de 2002, se calculó que una estimación de la supervivencia mediana era al menos 15 meses. Esto es significativamente mayor que la supervivencia mediana de los pacientes sin tratar (3 meses) y la supervivencia mediana de los pacientes tratados con la terapia estándar aprobada por la FDA, a saber, la administración de interleucina 2 a dosis alta (10–12 meses).

Así pues, resulta evidente que el anticuerpo quimérico G250 es un agente terapéutico adecuado para el tratamiento del carcinoma de células renales. En una realización preferida, el tratamiento comprende una extirpación quirúrgica del tumor principal y una administración subsiguiente de G250, a fin de eliminar las metástasis distribuidas por todo el cuerpo.

-LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wilex AG

<120> Línea de Células de Hibridoma

<130> 26037P WO_CG

<140> PCT/EP02/01282
<141> 2002-02-07

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 357
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: gen de anticuerpo quimérico ratón/humano

<400> 1
gacgtgaagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ttggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactattaca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagagaaga ggctggagtt ggtcgcagcc attaatagtg atggtggtat cacctactat 180
ctagacactg tgaagggccg attcaccatt tcaagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccttgt tttactgtgc aagacaccgc 300
tcgggctact tttctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

<210> 2
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: gen de anticuerpo quimérico ratón/humano

<400> 2
gacattgtga tgacccagtc tcaaagattc atgtccacaa cagtaggaga cagggtcagc 60
atcacctgca aggccagtca gaatgtggtt tctgctgttg cctggtatca acagaaacca 120
ggacaatctc ctaaactact gatttactca gcatccaatc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tatgcagtct 240
gaagacctgg ctgatttttt ctgtcaacaa tatagcaact atccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un anticuerpo G250 para la fabricación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de pacientes de carcinoma de células renales después de la cirugía, en donde el anticuerpo G250 es producido por la célula de hibridoma DSM ACC 2526 o una célula de progenie de la misma, en donde la célula de progenie se ha obtenido por transferencia de material genético codificante del anticuerpo G250 o al menos el sitio de fijación de antígeno del mismo a una célula receptora.

2. El uso de la reivindicación 1 para el tratamiento de metástasis después de cirugía de tumores.

3. Uso de un anticuerpo G250 para la fabricación de un agente para provocar una respuesta inmune retardada en pacientes de cáncer más de seis meses después del comienzo de la terapia en el tratamiento del carcinoma de células renales, en donde el anticuerpo G250 es producido por la célula de hibridoma DSM ACC 2526 o una célula de progenie de la misma, en donde la célula de progenie se ha obtenido por transferencia de material genético codificante del anticuerpo G250 o al menos el sitio de fijación de antígeno del mismo a una célula receptora.

4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena simple o un fragmento de anticuerpo $F(ab')_2$, Fab', o Fab.

5. El uso de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico G250 como tal.

6. El uso de la reivindicación 5, en donde la formulación farmacéutica comprende un anticuerpo quimérico G250 acoplado a una citocina tal como IL-2, TNF y/o GM-CSF.

7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el ácido nucleico codificante del anticuerpo G250 comprende una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2.

8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el ácido nucleico codificante del anticuerpo G250 comprende
a) una secuencia de nucleótidos que codifica las regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2, y/o CDR3 del sitio de fijación de antígeno de la cadena pesada como se muestra en la Figura 1, designado H1-H3, y en SEQ ID NO: 1, y/o
b) una secuencia de nucleótidos que codifica las regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2, y/o CDR3 del sitio de fijación de antígeno de la cadena ligera como se muestra en la Figura 1, designado L1-L3, y en SEQ ID NO: 2.

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo G250 comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, y en donde el anticuerpo se fija selectivamente al antígeno G250.

10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo G250 comprende:
(a) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 como se muestra en Fig. 1 o al menos la región CDR3 de la cadena pesada de G250 o una región CDR3 de G250 variante que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente 90% con la región CDR3 de la cadena pesada de G250 original como se muestra en Fig. 1 al nivel de aminoácidos y/o
(b) una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 como se muestra en Fig. 1 o al menos la región CDR3 de la cadena ligera de G250 o una región CDR3 variante de G250 que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente 90% con la región CDR3 de la cadena ligera de G250 original como se muestra en Fig. 1 al nivel de aminoácidos,
en donde dicha región variante CDR3 de la cadena pesada y/o de la cadena ligera tiene características equivalentes de fijación de antígeno comparada con la región CDR3 original.

11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde los pacientes tienen enfermedad progresiva.

12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde los pacientes eran refractarios a la terapia previa con citocinas o quimioterapia, o habían sufrido recidiva(s) después de tratamiento con citocinas.

Figura 1

VH G250

```
1/1                                 31/11                                61/21                                91/31
gac gtg aag ctc gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag ctt gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aac tat tac atg tct tgg gtt cgc cag act
D  V  K  L  V  E  S  G  G  G  L  V  K  L  G  G  S  L  K  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  N  Y  Y  M  S  W  V  R  Q  T
                                                                                                            H1

121/41                              151/51                               181/61                               211/71
cca gag aag agg ctg gag ttg gtc gca gcc att aat agt gat ggt ggt atc acc tac tat cta gac act gtg aag ggc cga ttc acc att tca aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac
P  E  K  R  L  E  L  V  A  A  I  N  S  D  G  G  I  T  Y  Y  L  D  T  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  A  K  N  T  L  Y
                           H2

241/81                              271/91                               301/101                              331/111
ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc ttg ttt tac tgt gca aga cac cgc tcg ggc tac ttt tct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca
L  Q  M  S  S  L  K  S  E  D  T  A  L  F  Y  C  A  R  H  R  S  G  Y  F  S  M  D  Y  W  G  Q  G  T  S  V  T  V  S  S
                                                      H3
```

VL G250

```
1/1                                 31/11                                61/21                                91/31
gac att gtg atg acc cag tct caa aga ttc atg tcc aca aca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg gtt tct gct gtt gcc tgg tat caa cag aaa cca
D  I  V  M  T  Q  S  Q  R  F  M  S  T  T  V  G  D  R  V  S  I  T  C  K  A  S  Q  N  V  V  S  A  V  A  W  Y  Q  Q  K  P
                                                                        L1

121/41                              151/51                               181/61                               211/71
gga caa tct cct aaa cta ctg att tac tca gca tcc aat cgg tac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat atg cag tct
G  Q  S  P  K  L  L  I  Y  S  A  S  N  R  Y  T  G  V  P  D  R  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  N  M  Q  S
                           L2

241/81                              271/91                               301/101
gaa gac ctg gct gat ttt ttc tgt caa caa tat agc aac tat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa
E  D  L  A  D  F  F  C  Q  Q  Y  S  N  Y  P  W  T  F  G  G  G  T  K  L  E  I  K
                                    L3
```

CDRs: H1, H2, H3 y L1, L2, L3
Definición de CDR de acuerdo con el esquema de Kabat