

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 118**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2013 PCT/US2013/038135**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13163377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2013 E 13720714 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2841456**

54 Título: **Proteínas de unión a antígeno de ligando CD30 humano**

30 Prioridad:

27.04.2012 US 201261639637 P

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

18.09.2018

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (50.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK y

AMGEN INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

ANDERSEN, METTE DAHL;

DANTZLER, JEFF;

ARMITAGE, RICHARD J. y

CLARK, RUTILIO

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 682 118 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

Proteínas de unión a antígeno de ligando CD30 humano

5 ANTECEDENTES

El ligando CD30 (CD30L, CD153), el ligando de origen natural para CD30, es una glucoproteína de membrana tipo II que se une específicamente a CD30, lo que provoca que CD30 transmita una señal a través de su dominio citoplásmico. CD30 y CD30L son glucoproteínas de superficie celular que interactúan que son miembros de las superfamilias TNFR y TNF, respectivamente (Durkop et al, Cell, 68:421, 1992; Smith et al, Cell, 73:1349, 1993; Patentes de Estados Unidos N.º: 5.480.981; 5.677.430; 6.143.869 y 6.652.854). La expresión de CD30 y CD30L está restringida a las células del sistema inmune y está estrictamente regulada. CD30 se expresa principalmente en los linfocitos B activados y subconjuntos de linfocitos T con un fenotipo activado/de memoria (Ellis et al., J. Immunol., 151: 2380, 1993; Falini et al., Blood, 85: 1, 1995). CD30L se expresa a altos niveles en linfocitos T humanos y de ratón activados (Shimozato et al, Biochem. & Biophys. Res. Comm., 256: 519, 1999; Armitage, J. Biological Regulators & Homeostatic Agents, 14: 142, 2000). Se producen cambios drásticos en la expresión génica relativa de CD30L a medida que los linfocitos B transitan a través de centros germinales (Klein et al, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 100: 2639, 2003). Por lo tanto, la expresión de CD30L en linfocitos B puede ser específica del estadio y del contexto. CD30L también parece ser un marcador de una población única de células accesorias de tipo células dendríticas de ratón que están presentes en los folículos esplénicos donde los linfocitos T interactúan con los linfocitos B (Kim et al., Immunity, 18:643, 2003).

Las interacciones entre las células que expresan CD30/CD30L parecen ser importantes para la generación de respuestas de anticuerpos secundarios o de clase conmutada dependientes de linfocitos T fuertes. La evidencia para tal papel incluye datos de estudios *in vitro* (Shanebeck et al., Eur. J. Immunol., 25:2147-53, 1995) e *in vivo* (Gaspal et al., J. Immunol., 174:3891-6, 2005) en sistemas de ratón. Además, se ha demostrado que el tratamiento *in vivo* de ratones con un mAb de rata bloqueador, pero no agotador, de CD30L de ratón inhibe el desarrollo o la progresión de la enfermedad en varios modelos de enfermedades autoinmunes dependientes de linfocitos T y/o B (Patente de Estados Unidos N.º 6.667.039). En los modelos con un fuerte componente inmune humoral, la inhibición de la enfermedad se correlaciona con la inhibición de la respuesta de anticuerpos asociada a la enfermedad.

Por lo tanto, sería útil tener composiciones que comprendan anticuerpos humanos y/o regiones de unión a antígeno que se unan a CD30L para su uso en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

35 CHAKRABARTY et al. (2003) Clin. Exp. Immunol. 133, 318-325, divulgan el clon de anticuerpo anti-CD30L RM153, que bloquea la interacción de CD30L con CD30.

El documento WO 02/11767 divulga agentes que bloquean la interacción CD30/CD30L y el mAb anti-CD30L M15.

40 FRANKE et al. (2000) HYBRIDOMA 19(1), 43-48 divulgan anticuerpos que se unen a CD30L humano, incluyendo CD30L antihumano M81.

Smith et al. (1993) Cell 73, 1349-1360 describen la homología de secuencia entre CD30L murino y humano.

45 Kennedy et al. (2006) Immunology 118, 143-152 describen la biología del ligando CD30 y su papel en la inmunidad humoral y anticuerpos que se unen a CD30L murino, incluyendo el mAb RM 153.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a CD30L humano como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de la invención.

55

En un tercer aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico

que codifica un anticuerpo de la invención.

DESCRIPCIÓN GENERAL

5 Como se describe en este documento, las proteínas de unión al antígeno CD30L humanas pueden reducir, inhibir, interferir y/o modular al menos una de las respuestas biológicas relacionadas con una interacción CD30L/CD30, y como tales, son útiles para mejorar los efectos de enfermedades o trastornos relacionados con CD30L. Las proteínas de unión a antígeno CD30L pueden usarse, por ejemplo, para reducir, inhibir, interferir y/o modular las interacciones CD30L/CD30.

10

Se describe una proteína de unión a antígeno aislada que se une a una región C-terminal de CD30L que incluye AA 201-234. También se describe una proteína de unión a antígeno que se une a una región C-terminal de CD30L incluyendo AA 201-234 y una región adicional de CD30L localizada en la parte N-terminal de la región extracelular, que se define por AA 75-95. También se describe una proteína de unión a antígeno que tiene al menos una
 15 propiedad seleccionada del grupo que consiste en: a) inhibir la interacción CD30/CD30L; b) inhibir la inducción de IL-8 inducida por CD30L; c) competición cruzada con uno de los anticuerpos A-F para la unión a CD30L humano; d) una constante de disociación para CD30L humana es como máximo de 70 pM, y e) unión a CD30L humano con sustancialmente la misma afinidad o mayor (K_D inferior) que uno de los anticuerpos A-F. La afinidad (o K_D) se puede determinar como se conoce por el experto en la técnica, tal como por SPR o por FACS como se describe en el
 20 Ejemplo 4 en el presente documento.

También se describe una proteína de unión a antígeno que se une a CD30L y compite con un Fab de uno o más de los anticuerpos A, B, C, D, E y F para unirse a CD30L. Como alternativa, dicha proteína de unión a antígeno se caracteriza como una proteína de unión a antígeno cuya unión a hCD30L se inhibe por la unión de un Fab de uno o
 25 más de los anticuerpos A, B, C, D, E y F. Aquí, el Fab puede ser un Fab de anticuerpo A que incluye cada uno de A1, A2, A3, A4, A5 y A6.

También se describe una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L, que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 seleccionadas del grupo
 30 que consiste en: a) una CDRH1 que difiere en no más de cuatro, tres, dos o una sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos de una CDRH1 como se muestra en la TABLA 3; b) una CDRH2 que difiere en no más de siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos de una CDRH2 como se muestra en la TABLA 3; c) una CDRH3 que difiere en no más de once, diez, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos de una CDRH3 como se muestra en
 35 la TABLA 3; y que comprende al menos una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 seleccionadas del grupos que consiste en: d) una CDRL1 que difiere en no más de cuatro, tres, dos o una sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos de una CDRL1 como se muestra en la TABLA 3; e) una CDRL2 que difiere en no más de dos o una sustituciones, inserciones o deleciones aminoacídica de una CDRL2 como se muestra en la TABLA 3; f) una CDRL3 que difiere en no más de dos o una sustituciones,
 40 inserciones o deleciones de aminoácidos de una CDRL3 como se muestra en la TABLA 3. También se describe una CDRH1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, y 33; una CDRH2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 34; una CDRH3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 25, 26, 27, 28, 29, y 35; una CDRL1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 30; una CDRL2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, y 31; y una CDRL3
 45 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 11, 12, 13, y 32.

También se describe una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L humano que comprende al menos una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la CDR1 comprende los residuos aminoacídicos 23-36, la CDR2 comprende 52-58 y la CDR3 comprende 91-100 de SEQ ID
 50 NOs: 36, 28, 40, 42, o 44; o b) una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la CDR1 comprende los residuos aminoacídicos 25-36, la CDR2 comprende los residuos aminoacídicos 52-58 y la CDR3 comprende los residuos aminoacídicos 91-100 de SEQ ID NO: 46; y al menos una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la CDR1 1 comprende los residuos aminoacídicos 31-35, la CDR2 comprende los residuos aminoacídicos 50-65 y la CDR3 comprende los residuos aminoacídicos 98-113
 55 de SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 o 72. También se describe una proteína de unión a antígeno que comprende al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región variable de cadena ligera. También se describe una proteína de unión a antígeno que comprende al menos dos regiones variables de cadena pesada y al menos dos regiones variables de cadena ligera.

- Se describe en el presente documento una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de región variable de cadena pesada difiere en no más de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de una
- 5 secuencia de región variable de cadena pesada como se muestra en la TABLA 2; y en la que la secuencia de región variable de cadena ligera difiere en no más de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia de región variable de cadena ligera como se muestra en la TABLA 1.
- 10 También se describe una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, y 72; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 88 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 36, 38, 40, 42, 44, y 46.
- 15 También se describe una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L seleccionada del grupo que consiste en a) una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62, y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 36; b) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:38; c) una región variable de
- 20 cadena pesada de SEQ ID NO:66 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:40; d) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:68 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:42; e) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:70 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:44; y f) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:72 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:46. La proteína de unión a antígeno aislada puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un
- 25 anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de anticuerpo de los mismos. También se describe un fragmento de anticuerpo que es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diacuerpo, o una molécula de anticuerpo monocatenario. También se describe una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humano. La proteína de unión a antígeno puede ser un anticuerpo monoclonal. La proteína de unión a antígeno puede ser del
- 30 tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína de unión a antígeno puede ser del tipo IgG1 o IgG2.
- También se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente. Al menos una región variable de cadena pesada puede codificarse por una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69,
- 35 71 y 73, y al menos una región variable de cadena ligera puede codificarse por una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:37, 39, 41, 43, 45, y 47. La molécula de ácido nucleico puede estar unida operativamente a una secuencia de control. También se describen vectores que comprenden un ácido nucleico descrito anteriormente y células huésped que comprenden dichos vectores. También se describe un polinucleótido aislado suficiente para su uso como sonda de hibridación, cebador de PCR o cebador de
- 40 secuenciación que es un fragmento de la molécula de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente o su complemento.
- También se describe un método para preparar la proteína de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente que comprende la etapa de preparar la proteína de unión a antígeno a partir de una célula huésped que secreta la
- 45 proteína de unión a antígeno.
- También se describe una proteína de unión a antígeno aislada como se ha descrito anteriormente, en la que la proteína de unión a antígeno tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en: a) inhibir la interacción CD30/CD30L; b) inhibir la inducción de IL-8 inducida por CD30L; c) la competición cruzada con uno de
- 50 los anticuerpos A-F para la unión a CD30L humano; d) una constante de disociación ≤ 70 pM y e) la unión a CD30L humano con sustancialmente la misma Kd que uno de los anticuerpos A-F.
- También se describe una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se describen dichas
- 55 composiciones farmacéuticas que comprenden además un grupo marcador o un grupo efector. El grupo marcador puede seleccionarse del grupo que consiste en etiquetas isotópicas, etiquetas magnéticas, restos activos redox, tintes ópticos, grupos biotinilados y epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario. El grupo efector puede seleccionarse del grupo que consiste en un radioisótopo, radionúclido, una toxina, un grupo terapéutico y un grupo quimioterapéutico. Como se describe en el presente documento, la proteína

de unión a antígeno se puede acoplar a un grupo marcador.

También se describe un método para tratar o prevenir una afección asociada con CD30L en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de al menos una proteína de unión a antígeno aislada como se ha descrito anteriormente. Aquí, la proteína de unión a antígeno aislada puede administrarse en solitario o como una terapia de combinación.

También se describe un método para reducir la actividad de CD30L en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos una proteína de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente.

También se describe una proteína de unión a antígeno que compite con al menos una proteína de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente.

También se describe una proteína de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente que está afucosilada total o parcialmente.

FIGURAS

Figura 1A Células de Ramos y efectores NK, Cuadrados de color blanco: Rituxan (IgG1), Rombos de color negro: Anticuerpo A1 IgG1f, Cuadrados de color negro: Anticuerpo A1 IgG1, Círculos de color blanco: Anticuerpo A1 IgG2.

Figura 1B Células JD38 y efectores NK, Cuadrados de color blanco: Rituxan (IgG1) Rombos de color negro: Anticuerpo A1 IgG1f, Cuadrados de color negro: Anticuerpo A1 IgG1, Círculos de color blanco: Anticuerpo A1 IgG2.

Figura 1C Células DS179 y efectores NK, Cuadrados de color blanco: Rituxan (IgG1), Rombos de color negro: Anticuerpo A1 IgG1f, Cuadrados de color negro: Anticuerpo A1 IgG1, Círculos de color blanco: Anticuerpo A1 IgG2.

Figura 1D Células EW36 y efectores NK, Cuadrados de color blanco: Rituxan (IgG1), Rombos de color negro: Anticuerpo A1 IgG1f, Cuadrados de color negro: Anticuerpo A1 IgG1, Círculos de color blanco: Anticuerpo A1 IgG2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen en el presente documento composiciones, kits y métodos relacionados con proteínas de unión a antígeno CD30L, incluyendo proteínas de unión a antígeno que bloquean la interacción entre CD30L y CD30, tales como anticuerpos anti-CD30L, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD30L neutralizantes, fragmentos de anticuerpos, o derivados de anticuerpos. También se describen polinucleótidos y derivados y fragmentos de los mismos, que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica todo o una porción de un polipéptido que se une a CD30L, por ejemplo, un polinucleótido que codifica todo o parte de un anticuerpo anti-CD30L, fragmento de anticuerpo, o derivado de anticuerpo, plásmidos y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, y células o líneas celulares que comprenden dichos polinucleótidos y/o vectores y plásmidos. Los métodos descritos incluyen, por ejemplo, métodos de fabricación, identificación o aislamiento de proteínas de unión a antígeno CD30L, tales como anticuerpos anti-CD30L, métodos para determinar si una molécula bloquea la interacción entre CD30L y CD30, métodos para determinar si una molécula antagoniza CD30L, métodos para fabricar composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden una proteína de unión a antígeno CD30L, y métodos para administrar una proteína de unión a antígeno CD30L a un sujeto, por ejemplo, métodos para tratar una afección mediada por CD30L, y para bloquear la interacción entre CD30L y CD30, *in vivo* o *in vitro*.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Además, a menos que lo exija el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

- Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. La terminología utilizada en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descrita en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas estándar pueden usarse para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.
- 10 El término "ligando CD30" (CD30L) se refiere a un género de polipéptidos que son capaces de unirse a CD30, como se divulga en Smith et al., *Cell* 73:1349-1360, 1993 y la Patente de Estados Unidos N.º 5.480.981, incluyendo muteínas de unión a CD30 de los mismos; dichos polipéptidos incluyen proteínas unidas a la membrana (que comprenden un dominio citoplasmático, una región transmembrana, y un dominio extracelular), así como proteínas truncadas que conservan la propiedad de unión a CD30. Dichas proteínas truncadas incluyen, por ejemplo, CD30L
- 15 soluble que comprende solo el dominio extracelular (unión a receptor). También se incluyen fragmentos de CD30L, incluyendo porciones de un polipéptido CD30L de longitud completa que conserva la capacidad de unirse a CD30, o que son capaces de provocar a un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido CD30 o a una porción de CD30 de longitud completa que es capaz de transmitir una señal biológica como la activación de NF- κ B.
- 20 El término "CD30" se refiere a un receptor que es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF/NGF, cuya clonación se describe en Durkop et al. (*Cell* 68:421, 1992). La expresión "CD30 soluble" (sCD30) se refiere a moléculas solubles que comprenden todo o parte del dominio extracelular de la proteína CD30, y que conservan la capacidad de unirse específicamente con CD30L. Los polipéptidos CD30 solubles incluyen sCD30 recombinante y proteínas sCD30 de origen natural de forma altamente purificada.
- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de CD30" se refiere a una porción de un polipéptido CD30 de longitud completa que conserva la capacidad de unirse a CD30L o que es capaz de provocar un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido CD30 o una porción de CD30 de longitud completa que es capaz de transmitir una señal biológica tal como la activación de NF- κ B.
- 30 La expresión "interacción CD30/CD30L" como se usa en el presente documento se refiere a la unión específica de CD30 a CD30L, que da como resultado la transducción de señal por CD30. Esto incluye casos en los que al menos un compañero de unión es un fragmento de CD30 o CD30L, es decir, el término puede referirse a la interacción de unión de un fragmento de CD30 a CD30L, CD30 a un fragmento de CD30L, o un fragmento de CD30 a un fragmento de CD30L. Además, una interacción CD30/CD30L puede implicar un análogo de CD30 (tal como una variante alélica o muteína) que es capaz de unirse específicamente a CD30L, o puede implicar un análogo de CD30L (tal como una variante alélica o muteína) que puede unirse específicamente con CD30. Además, una interacción CD30/CD30L puede implicar proteínas CD30 o CD30L endógenas o puede implicar CD30 o CD30L recombinante expresado por una célula transfectada con un ácido nucleico que codifica la proteína recombinante.
- 40 El término "polinucleótido" incluye tanto ácidos nucleicos monocatenarios como bicatenarios e incluye ADN genómico, ARN, ARNm, ADNc u origen sintético o alguna combinación de los mismos que no está asociada con secuencias normalmente encontradas en la naturaleza. Los polinucleótidos aislados que comprenden secuencias especificadas pueden incluir, además de las secuencias especificadas, secuencias de codificación para hasta diez o
- 45 incluso hasta veinte proteínas diferentes o porciones de las mismas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas operativamente que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácido nucleico citadas, y/o pueden incluir secuencias de vectores. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los dos tipos de nucleótidos. Las modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromouridina y derivados de inosina, modificaciones de ribosa tales como 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de enlace internucleotídico tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoiltioato, fosforaniladato y fosforoamidato.
- 50 El término "oligonucleótido" significa un polinucleótido que comprende 100 nucleótidos o menos. En algunos casos, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases. En otros casos, los oligonucleótidos tienen 12, 13, 14, 15,
- 55 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido. Un oligonucleótido puede incluir un marcador detectable, tal como un radiomarcador, un marcador fluorescente, un hapteno o un marcador antigénico, para ensayos de detección. Los oligonucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, como cebadores de PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína nativa, es decir, una proteína producida por una célula natural y no recombinante; o es producida por una célula genéticamente modificada o recombinante, y comprende moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen una o más deleciones de, inserciones a, y/o sustituciones de los residuos de aminoácidos de la secuencia nativa. El término también incluye polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos de un correspondiente aminoácido de origen natural y polímeros. Los términos "polipéptido" y "proteína" incluyen proteínas de unión al antígeno CD30L (tales como anticuerpos) y secuencias que tienen una o más deleciones de, adiciones a, y/o sustituciones de los residuos de aminoácidos de la secuencia de proteína de unión a antígeno. El término "fragmento de polipéptido" se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino terminal, una deleción carboxilo terminal y/o una deleción interna en comparación con la proteína nativa de longitud completa. Dichos fragmentos pueden contener también aminoácidos modificados en comparación con la proteína nativa. En ciertos casos, los fragmentos tienen de aproximadamente cinco a 500 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, los fragmentos pueden tener al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos de polipéptidos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos inmunológicamente funcionales, incluyendo dominios de unión. En el caso de una proteína de unión a antígeno CD30L, tal como un anticuerpo, los fragmentos útiles incluyen, pero sin limitación, una o más regiones CDR, un dominio variable de una cadena pesada o ligera, una porción de una cadena del anticuerpo, una porción de una región variable que incluye menos de tres CDR, y similares.

"Aminoácido" incluye su significado normal en la técnica. Los veinte aminoácidos de origen natural y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase, *Immunology-A Synthesis*, 2ª Edición, (E. S. Golub y D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos [alfa], [alfa]-disustituidos, aminoácidos N-alquilo y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina, [gamma]-carboxiglutamato, [épsilon]-N,N,N-trimetil lisina, [épsilon]-N-acetil lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, [sigma]-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de polipéptido utilizada en el presente documento, la dirección de la izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección de la derecha es la dirección del terminal carboxilo, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

El término "proteína aislada" se refiere a una proteína, tal como una proteína de unión a antígeno (un ejemplo de la cual podría ser un anticuerpo), que se purifica a partir de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que podrían interferir con sus propiedades terapéuticas, de diagnóstico, profilácticas, de investigación u otro uso. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que la especie de molécula descrita es la especie predominante presente, es decir, en una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la misma mezcla. En ciertos casos, una molécula sustancialmente pura es una composición en la que la especie objeto comprende al menos el 50 % (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otros casos, una composición sustancialmente pura comprenderá al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o el 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En ciertos casos, una sustancia esencialmente homogénea se ha purificado hasta un grado tal que las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición por métodos de detección convencionales y, por lo tanto, la composición consiste en una única especie macromolecular detectable.

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión al antígeno, tal como un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos se insertan en, se suprimen de, y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptidos. Las variantes incluyen proteínas de fusión. Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido que se ha modificado químicamente de alguna manera distinta de las variantes de inserción, deleción o sustitución, por ejemplo, a través de la conjugación con otro resto químico.

Los términos "de origen natural" o "nativo" como se usan a lo largo de la memoria descriptiva en relación con materiales biológicos tales como polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y similares, se refieren a materiales que se encuentran en la naturaleza. En este contexto, una "proteína recombinante" es una proteína fabricada utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe en el presente documento. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo o un fragmento del mismo que pueda competir con el anticuerpo intacto para la unión específica al antígeno diana e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un anticuerpo como tal es una especie de una proteína de unión a antígeno. A menos que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" incluye, además de los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y muteínas de los mismos, cuyos ejemplos se describen a continuación. Un anticuerpo intacto comprenderá generalmente al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, pero en algunos casos, puede incluir menos cadenas, tales como anticuerpos de origen natural en camélidos que pueden comprender solamente cadenas pesadas. Los anticuerpos se pueden derivar únicamente de una única fuente, o pueden ser "quiméricos", es decir, se pueden derivar diferentes porciones del anticuerpo a partir de dos anticuerpos diferentes como se describe adicionalmente más adelante. Las proteínas de unión a antígeno, anticuerpos o fragmentos de unión se pueden producir en hibridomas, mediante técnicas de ADN recombinante, o por división enzimática o química de anticuerpos intactos.

El término "fragmento funcional" (o simplemente "fragmento") de un anticuerpo o cadena de inmunoglobulina (cadena pesada o ligera), como se usa en el presente documento, es una proteína de unión a antígeno que comprende una porción (independientemente de cómo se obtiene o sintetiza esa porción) de un anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa, pero que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Dichos fragmentos son biológicamente activos porque se unen específicamente al antígeno diana y pueden competir con otras proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos intactos, para la unión específica a un epítipo dado. En un caso, tal fragmento conservará al menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada de longitud completa, y en algunos casos, comprenderá una única cadena pesada y/o cadena ligera o parte de la misma. Estos fragmentos biológicamente activos se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante, o se pueden producir por escisión enzimática o química de proteínas de unión al antígeno, incluyendo anticuerpos intactos. Los fragmentos incluyen, pero sin limitación, fragmentos inmunológicamente funcionales tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio y anticuerpos monocatenarios, y se pueden derivar de cualquier fuente de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, ser humano, ratón, rata, camélido o conejo. Se contempla además que una porción funcional de las proteínas de unión al antígeno divulgadas en el presente documento, por ejemplo, una o más CDR, podría unirse covalentemente a una segunda proteína o a una molécula pequeña para crear un agente terapéutico dirigido a una diana particular en el cuerpo, que poseen propiedades terapéuticas bifuncionales, o que tienen una semivida en suero prolongada.

El término "competir" cuando se usa en el contexto de proteínas de unión al antígeno (por ejemplo, proteínas neutralizantes de unión al antígeno o anticuerpos neutralizantes) se refiere a la competición entre las proteínas de unión al antígeno como se determina mediante un ensayo en el que la proteína de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo) bajo ensayo previene o inhibe la unión específica de una proteína de unión al antígeno de referencia (por ejemplo, un ligando o un anticuerpo de referencia) a un antígeno común (por ejemplo, una proteína CD30L o un fragmento de la misma). Se pueden usar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición en sándwich (véase, por ejemplo, Stahl et al., 1983, *Methods in Enzymology* 92: 242-253); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619), ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayos en sándwich marcado directos en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA marcado directo en fase sólida usando el marcador I-125 (véase, por ejemplo, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (véase, por ejemplo, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176: 546-552); y RIA marcado directamente (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estas, una proteína de unión al antígeno de ensayo no marcada y una proteína de unión al antígeno de referencia marcada. Se pueden tomar diferentes enfoques como se conoce por el experto. Una opción alternativa incluye tener la proteína de unión al antígeno de referencia unida a la placa, opcionalmente a través de una matriz flexible. Una variación adicional puede basarse en el orden de adición, es decir, si el antígeno se mezcla primero con la proteína de unión al antígeno de referencia unida a la placa o la proteína de unión al antígeno de ensayo. En todos los escenarios, la saturación del antígeno por la proteína de unión a antígeno es necesaria para evitar resultados falsos no competitivos.

La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la proteína de unión al antígeno de ensayo. Normalmente, la proteína de unión al antígeno de ensayo está presente en exceso. Las proteínas de unión al antígeno identificadas por el ensayo de competición

(proteínas de unión al antígeno competidoras) incluyen proteínas de unión al antígeno que se unen al mismo epítipo que las proteínas de unión al antígeno de referencia y las proteínas de unión al antígeno que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido por la proteína de unión al antígeno de referencia para que se produzca impedimento estérico. Normalmente, cuando una proteína competidora de unión al antígeno está presente en exceso, inhibirá la unión específica de una proteína de unión al antígeno de referencia a un antígeno común al menos en un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algún caso, la unión se inhibe en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

Los experimentos de competición se pueden hacer con diferentes tipos de moléculas que pueden tener diferente sensibilidad. Si la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, la molécula será bivalente. Si la molécula de unión al antígeno es un Fab, es monovalente y substancialmente más pequeña que un anticuerpo de longitud completa, lo que da como resultado menos impedimento estérico. En experimentos de competición, para cierta proteína de unión a antígeno, la unión a hCD30L se inhibe por la unión de un Fab de una proteína de unión a antígeno de anticuerpo como se define en el presente documento, tal como uno cualquiera de los anticuerpos A, B, C, D, E y F.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une una proteína de unión al antígeno. Los epítipos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Los determinantes de epítipo pueden incluir agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 aminoácidos en una conformación espacial única. Los epítipos se pueden determinar utilizando métodos conocidos en la técnica.

La unión de una proteína de unión a antígeno también puede describirse por la región o regiones del antígeno con las que interactúa la proteína de unión a antígeno. Dicha región o regiones de interacción se pueden determinar por diversos métodos conocidos en la técnica, tal como realizando ensayos de unión usando moléculas de antígeno variantes o mediante HX-MS como se ilustra en el presente documento (véase el Ejemplo 6), donde se determina la región o regiones de interacción del antígeno con las proteínas de unión a antígeno.

La tecnología HX-MS aprovecha que el intercambio de hidrógeno (HX) de una proteína puede seguirse fácilmente por espectrometría de masas (MS). Al reemplazar el disolvente acuoso que contiene hidrógeno por un disolvente acuoso que contiene deuterio, la incorporación de un átomo de deuterio en un sitio determinado en una proteína dará lugar a un aumento en la masa de 1 Da. Este aumento de masa se puede controlar en función del tiempo mediante espectrometría de masas en muestras inactivadas de la reacción de intercambio. La información de marcado con deuterio puede subsituarse en las regiones de la proteína mediante digestión con pepsina en condiciones de inactivación y después del aumento en masa de los péptidos resultantes. Puede usarse HX-MS para hibridar los sitios implicados en interacciones moleculares identificando regiones de intercambio reducido de hidrógeno tras la formación de complejos proteína-proteína que incluyen interacciones anticuerpo-antígeno. Normalmente, las interfaces de unión se revelarán mediante marcadas reducciones en el intercambio de hidrógeno debido a la exclusión estérica del disolvente. La formación del complejo proteína-proteína puede detectarse mediante HX-MS simplemente midiendo la cantidad total de deuterio incorporado en cualquiera de los miembros proteicos en presencia y en ausencia del compañero de unión respectivo en función del tiempo. La técnica HX-MS usa los componentes nativos, es decir, proteína y anticuerpo o fragmento Fab, y se realiza en solución. Por lo tanto, la HX-MS proporciona la posibilidad de imitar las condiciones *in vivo* (para una revisión de la tecnología HX-MS, véase, por ejemplo, Wales y Engen, *Mass Spectrom. Rev.* 25, 158 (2006)).

Ciertas proteínas de unión a antígeno como se describe en el presente documento interactúan con o se unen a CD30L a través de una región C-terminal de CD30L humano definida por AA 201-234. Puede ser que la proteína de unión a antígeno se una a una región C-terminal de CD30L humano definida por AA 201-234, o una región menor, tal como AA 205-230 o AA 211-226. Como se ha descrito anteriormente, un epítipo puede ser no contiguo y también lo puede ser la región de interacción. En un caso, una proteína de unión a antígeno de acuerdo con la invención se une al menos a dos regiones de CD30L. Dichas proteínas de unión a antígeno adicionales de acuerdo con la invención pueden interactuar con una región C-terminal como se ha definido anteriormente y una región adicional de CD30L humana localizada en la parte N-terminal del dominio extracelular, tal como una región definida por AA70-100 de hCD30L de longitud completa. Dichas proteínas de unión a antígeno pueden unirse a AA 75-95 o a una región más corta, tal como AA 80-90 o AA 82-88, además de la región C-terminal definida por AA 201-234, AA

205-230 o AA 211-226.

Proteínas de unión a antígeno CD30L

5 Una "proteína de unión a antígeno" como se usa en el presente documento significa una proteína que se une específicamente a un antígeno diana especificado; el antígeno como se describe en el presente documento es CD30L, particularmente CD30L humano. Las proteínas de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, aquellas que bloquean o inhiben la interacción de CD30L y CD30. Dichas proteínas de unión a antígeno "bloqueadoras" pueden desarrollarse hacia CD30L, o un fragmento, variante o derivado del mismo, y cribarse en ensayos convencionales
 10 para determinar la capacidad de interferir con la interacción de CD30L y CD30. Los ejemplos de ensayos adecuados son ensayos que prueban la capacidad de las proteínas de unión a antígeno para inhibir la interacción de CD30L y CD30 y se describen en el presente documento. Las proteínas de unión a antígeno también incluyen aquellas que inhiben CD30L o activan CD30L. Dicha inhibición o neutralización altera una respuesta biológica en presencia de la proteína de unión a antígeno en comparación con la respuesta en ausencia de la proteína de unión a antígeno y
 15 puede determinarse usando ensayos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento, por ejemplo, inducen la producción de IL-8 a partir de células CD30⁺. Las proteínas de unión a antígeno como se divulgan en el presente documento tampoco se unen a otros miembros de la superfamilia de TNF, particularmente 4-1 BBL, OX-40L, TNF α , TNF β , RANKL, Trail, CD40L o CD27L.

20 Diferentes proteínas de unión a antígeno CD30L pueden unirse a diferentes dominios o epítopos de CD30L o actuar mediante diferentes mecanismos de acción. Una proteína de unión al antígeno CD30L no necesita inhibir completamente una actividad inducida por CD30L para encontrar el uso como se describe en el presente documento; más bien, las proteínas de unión a antígeno que reducen una actividad particular de CD30L también se
 25 contemplan para su uso. Las proteínas de unión a antígeno también incluyen aquellas que compiten de forma cruzada por la unión con CD30L humano; que se unen al mismo epítipo de CD30L humano; que se unen a CD30L humano con sustancialmente la misma Kd; que se unen a CD30L con sustancialmente la misma velocidad de desactivación; como cualquiera de las proteínas de unión a antígeno de referencia descritas en el presente documento. Se conocen en la técnica diversos métodos para medir dichas características y se describen en el
 30 presente documento.

También se describen las proteínas de unión a antígeno CD30L que agotan las células CD30L⁺. Con tales proteínas de unión a antígeno CD30L de agotamiento, la unión de la proteína de unión a antígeno a una célula que comprende su diana de antígeno da como resultado una inhibición del antígeno o la función celular o da como resultado la
 35 muerte de la célula. En un caso, un anticuerpo de agotamiento de la invención se une a CD30L y puede o no bloquear la unión de un ligando CD30L a CD30. Por lo tanto, las proteínas de unión a antígeno de agotamiento específicamente incluyen proteínas de unión a antígeno bloqueadoras y no bloqueadoras. En un caso, las proteínas de unión al antígeno CD30L que agotan las células CD30L⁺ pueden inducir apoptosis o muerte celular programada, según se determina mediante ensayos de apoptosis conocidos en la técnica. Dichas proteínas de unión al antígeno
 40 CD30L podrían tener un efecto inmunomodulador 1) eliminando las células que interactúan con células CD30L⁺ para inducir una respuesta inmune, y/o 2) eliminando las células en las que CD30L es un marcador de superficie celular de un tipo de célula que participa en una cierta respuesta inmune, pero no necesariamente necesita interactuar con una célula CD30⁺ para hacerlo. En este caso, CD30L sería un marcador del tipo de célula asociado con una enfermedad particular y la interacción CD30/CD30L podría no estar involucrada en la patogénesis de la propia
 45 enfermedad. Otro caso incluye las proteínas de unión a antígeno de agotamiento que comprenden toxina conjugada o agente citotóxico, en las que la toxina o agente citotóxico induce el agotamiento de una célula que se une al conjugado de proteína de unión a antígeno.

Una proteína de unión al antígeno puede comprender una porción que se une a un antígeno y, opcionalmente, una
 50 porción de supercántigo o marco que permite que la porción de unión al antígeno adopte una conformación que promueva la unión de la proteína de unión al antígeno al antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos del anticuerpo (por ejemplo, una porción de unión al antígeno de un anticuerpo), derivados de anticuerpos y análogos de anticuerpos. La proteína de unión al antígeno puede comprender un supercántigo de proteína alternativo o un supercántigo artificial con CDR injertadas o derivadas de CDR. Dichos
 55 supercántigos incluyen, pero sin limitación, supercántigos derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas, por ejemplo, para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión al antígeno, así como supercántigos completamente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véase, por ejemplo, Korndorfer et al., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, (2003) Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20:639-654. Además, se pueden utilizar miméticos de anticuerpos peptídicos

("PAM"), así como supercóntigos basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de fibronectina como supercóntigo.

Ciertas proteínas de unión al antígeno descritas en el presente documento son anticuerpos o se derivan de anticuerpos. Dichas proteínas de unión al antígeno incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos, miméticos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos, conjugados de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de los mismos, respectivamente. En algunos casos, la proteína de unión al antígeno es un fragmento inmunológico de un anticuerpo (por ejemplo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un scFv). Las diversas estructuras se describen y se definen adicionalmente en el presente documento.

Ciertas proteínas de unión al antígeno pueden comprender una o más CDR como se describe en el presente documento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más CDR). En algunos casos, la proteína de unión al antígeno comprende (a) una estructura polipeptídica, y (b) una o más CDR que se insertan en y/o se unen a la estructura polipeptídica. La estructura polipeptídica puede tomar una diversidad de formas diferentes. Por ejemplo, puede ser, o comprender, el marco de un anticuerpo de origen natural, o fragmento o variante del mismo, o puede ser de naturaleza completamente sintética. A continuación, se describen adicionalmente ejemplos de diversas estructuras polipeptídicas.

Algunas de las proteínas de unión a antígeno como se describen en el presente documento se unen específicamente a CD30L humano. "Unirse específicamente" como se usa en el presente documento significa que la constante de disociación de equilibrio (K_D) es $<10^{-8}$ a $<10^{-10}$ M, como alternativa $<10^{-9}$ a $<10^{-10}$ M, más particularmente $<10^{-11}$ M a $<10^{-12}$ M. En un caso, las proteínas de unión a antígeno se unen con una alta afinidad expresada por la constante de disociación de equilibrio (K_D) que es 10^{-8} , o tal como $5,0 \times 10^{-9}$ o tal como 10^{-9} o incluso $5,0 \times 10^{-10}$. La constante de disociación de equilibrio se puede determinar como se conoce en la técnica. En tales casos, la K_D se determina típicamente inmovilizando una especie a baja densidad (esta especie puede ser multivalente) e inyectando una serie de titulaciones de una especie monovalente (fase de asociación), y luego permitiendo una fase de disociación donde los complejos se desintegran. Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente se denominan constante de velocidad de asociación k_a y constante de velocidad de disociación k_d , respectivamente. Los datos resultantes se ajustan entonces a un modelo de unión 1:1 que se ajusta a 3 parámetros: constante de asociación k_a , constante de velocidad de disociación k_d , y $R_{máx}$, que se refiere a la densidad de superficie y la estequiometría. La relación de k_d/k_a es igual a la constante de disociación de equilibrio K_D .

La K_D también puede determinarse usando análisis FACS como se describe en el Ejemplo 4 en el presente documento, donde los anticuerpos que se unen a CD30L se expresan en células de Ramos.

Un caso se refiere a una proteína de unión a antígeno aislada como se describe en el presente documento, en donde dicha proteína de unión a antígeno tiene una afinidad (o K_D) por CD30L humana de al menos 75 pM, tal como 50 pM, tal como 40 pM. En casos adicionales, la constante de disociación (K_D) de la proteína de unión al antígeno con respecto a CD30L humano es como máximo 35 pM, tal como a lo sumo 25 pM, tal como 20 pM, tal como a lo sumo 15 pM.

La afinidad (o K_D) en dicha realización puede determinarse por FACS como se describe en el Ejemplo 4 en el presente documento.

También se describe una proteína de unión a antígeno que tiene una semivida de al menos un día *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano). En un caso, la proteína de unión al antígeno tiene una semivida de al menos tres días. En otro caso, el anticuerpo o porción del mismo tiene una semivida de cuatro días o más. En otro caso, el anticuerpo o porción del mismo tiene una semivida de ocho días o más. En otro caso, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo se deriva o se modifica de tal forma que tiene una semivida más larga en comparación con el anticuerpo no derivado o no modificado. En otro caso, la proteína de unión al antígeno contiene mutaciones puntuales para aumentar la semivida en suero, como se describe en la Publicación de la OMPI N.º WO 00/09560.

En casos donde la proteína de unión al antígeno se utiliza para aplicaciones terapéuticas, una proteína de unión al antígeno puede reducir, inhibir, interferir con o modular una o más actividades biológicas de CD30L, tal como la inducción de producción de IL-8 a partir de células CD30⁺.

Algunas de las proteínas de unión al antígeno que se describen tienen la estructura típicamente asociada con

anticuerpos de origen natural. Las unidades estructurales de estos anticuerpos comprenden típicamente uno o más tetrámeros, cada uno compuesto por dos dúplex idénticos de cadenas de polipéptidos, aunque algunas especies de mamíferos también producen anticuerpos que tienen solamente una única cadena pesada. En un anticuerpo típico, cada par o dúplex incluye una cadena "ligera" de longitud completa (en ciertos casos, aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (en ciertos casos, aproximadamente 50-70 kDa). Cada cadena de inmunoglobulina individual está compuesta por varios "dominios de inmunoglobulina", consistiendo cada uno en aproximadamente 90 a 110 aminoácidos y expresando un patrón de plegamiento característico. Estos dominios son las unidades básicas de las que están compuestos los polipéptidos de anticuerpo. La porción amino-terminal de cada cadena incluye típicamente una región variable que es responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal está más conservada evolutivamente que el otro extremo de la cadena y se denomina "región constante" o "región C". Las cadenas ligeras humanas generalmente se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda, y cada una de ellas contiene una región variable y un dominio constante. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como cadenas mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y estas definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varios subtipos, incluyendo, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los subtipos de IgM incluyen IgM1 e IgM2. Los subtipos de IgA incluyen IgA1 e IgA2. En seres humanos, los isotipos IgA e IgD contienen cuatro cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras; los isotipos IgG e IgE contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; y el isotipo IgM contiene cinco cadenas pesadas y cinco cadenas ligeras. La región constante de cadena pesada (CH) comprende típicamente uno o más dominios que pueden ser responsables de la función efectora. El número de dominios de regiones constantes de cadena pesada dependerá del isotipo. Las cadenas pesadas de IgG, por ejemplo, contienen cada una tres dominios de región CH conocidas como CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos que se proporcionan pueden tener cualquiera de estos isotipos y subtipos, por ejemplo, la proteína de unión al antígeno CD30L es del subtipo IgG1, IgG2 o IgG4. Si se desea una IgG4, también se puede desear introducir una mutación puntual (CPSCP->CPPCP) en la región bisagra como se describe en Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407) para aliviar una tendencia a formar enlaces disulfuro de cadena intra-H que pueden conducir a la heterogeneidad en los anticuerpos IgG4. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento que son de un tipo pueden cambiarse a un tipo diferente utilizando métodos de conmutación de subclase. Véase, por ejemplo, Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-316].

En cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente doce o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente diez aminoácidos más. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, 2ª ed., Cap. 7 (Paul, W., ed.) 1989, Nueva York: Raven Press. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente el sitio de unión a antígeno.

35 Regiones variables

Diversas regiones variables (o dominios) de cadena pesada y de cadena ligera descritas en el presente documento se representan en las TABLAS 1 y 2. Cada una de estas regiones variables puede estar unida, por ejemplo, a regiones constantes de cadena pesada y ligera descritas anteriormente. Además, cada una de las secuencias de cadena pesada y ligera así generadas se puede combinar para formar una estructura completa de proteína de unión al antígeno.

Tabla 1 Secuencias de región de cadena ligera variante ejemplares

VL1 SEQ ID NO: 36	QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSDVGVYDYV SWYQQHPGKAPKLMIIY EVSNRPS GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC SSYTSRSTWV FGGGTKLTVL
VL2 SEQ ID NO:38	QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSDVGLYNYV SWYQQHPDKAPKLMIF EVNNRPSG VSNRFGSGNSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSTWV FGGGTKLTVL
VL3 SEQ ID NO:40	QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSDIGLYDYV SWYQQHPDRAPKLIIF EVNNRPSGV SYRFGSGNSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSTWV FGGGTKLTVL
VL4 SEQ ID NO:42	QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSDIGLYNYV SWYQQHPGKAPKLIY EVINRPSGV SNRFGSGESGNTASLTISGLQAEDEANYYC SSYTSSTWV FGGGTKLTVL

VL5 SEQ ID NO:44	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT <i> TGSSSDIGTYNYVSWYQQYPGKAPELMIYEVNNRPSG</i> VSDRFSGSTSGNTASLTISGLQANDEADYYC <i>SSYSSSSTWVF</i> GGGTKLTVL
VL6 SEQ ID NO: 46	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT <i> TSSDVGLYNYVSWYQQYPGKAPKLMYEVSKRPS</i> GVSNRFSGSTSGNTASLTISGLQADDEADYSC <i>SSYTSSSTWVF</i> GGGTKLTVL

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están en negrita y cursiva, las regiones marco (FR) están en tipo simple. El orden de los elementos es: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

5

Tabla 2 Secuencias de región de cadena pesada variante ejemplares

VH1 SEQ ID NO:48	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGNTNY</i> <i>NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ TTVTVSS
VH2 SEQ ID NO: 50	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGNTNY</i> <i>NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ GTTVTVSS
VH3 SEQ ID NO:52	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGNTNY</i> <i>NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ GTTVTVSS
VH4 SEQ ID NO: 54	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGQNTNY</i> <i>NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ GTTVTVSS
VH5 SEQ ID NO:56	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGQNTNY</i> <i>NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ TTVTVSS
VH6 SEQ ID NO:58	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGNTNY</i> <i>NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ TTVTVSS
VH7 SEQ ID NO:60	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGQNTNY</i> <i>NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ TTVTVSS
VH8 SEQ ID NO:62	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWS</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYASGQNTNY</i> <i>NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR</i> <i>DYRVAGTYYYYYGLD</i> WVGQ GTTVTVSS
VH9 SEQ ID NO:64	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYIWT</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>RIYTSGITNYN</i> <i>PSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR</i> <i>ERVVGASRYYYYYGVD</i> WVGQ TTVTVSS

VH10 SEQ ID NO:66	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <i>SYW</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>R</i> <i>Y</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>G</i> <i>I</i> <i>T</i> <i>N</i> <i>Y</i> <i>PSL</i> <i>K</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>M</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>K</i> <i>N</i> <i>Q</i> <i>F</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>L</i> <i>S</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>V</i> <i>Y</i> <i>C</i> <i>A</i> <i>R</i> <i>E</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>G</i> <i>A</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>Y</i> <i>Y</i> <i>Y</i> <i>Y</i> <i>G</i> <i>V</i> <i>D</i> <i>W</i> <i>G</i> <i>Q</i> TTVTVSS
VH11	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <i>S</i> <i>S</i> <i>Y</i> <i>S</i> <i>W</i> <i>S</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>R</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>G</i> <i>R</i> <i>N</i>
SEQ ID NO:68	<i>Y</i> <i>N</i> <i>P</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>M</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>K</i> <i>N</i> <i>Q</i> <i>F</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>L</i> <i>N</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>V</i> <i>Y</i> <i>C</i> <i>A</i> <i>R</i> <i>D</i> <i>F</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>R</i> <i>R</i> <i>Y</i> <i>Y</i> <i>Y</i> <i>Y</i> <i>G</i> <i>M</i> <i>D</i> <i>W</i> <i>G</i> <i>Q</i> GTTVTVSS
VH12 SEQ ID NO:70	QVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVSGGSIT <i>N</i> <i>N</i> <i>Y</i> <i>W</i> <i>S</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>R</i> <i>V</i> <i>Y</i> <i>S</i> <i>S</i> <i>G</i> <i>L</i> <i>T</i> <i>N</i> <i>Y</i> <i>K</i> <i>P</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>M</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>K</i> <i>N</i> <i>Q</i> <i>F</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>R</i> <i>L</i> <i>N</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>V</i> <i>Y</i> <i>C</i> <i>A</i> <i>R</i> <i>E</i> <i>R</i> <i>A</i> <i>T</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>T</i> <i>R</i> <i>Y</i> <i>H</i> <i>D</i> <i>G</i> <i>M</i> <i>D</i> <i>W</i> <i>G</i> QGTSVTVSS
VH13 SEQ ID NO:72	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <i>S</i> <i>Y</i> <i>W</i> <i>S</i> WIRQPAGKGLEWIG <i>R</i> <i>F</i> <i>A</i> <i>S</i> <i>G</i> <i>S</i> <i>T</i> <i>N</i> <i>Y</i> <i>N</i> <i>P</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>R</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>M</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>K</i> <i>N</i> <i>Q</i> <i>F</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>L</i> <i>S</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>D</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>V</i> <i>Y</i> <i>C</i> <i>A</i> <i>K</i> <i>E</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>G</i> <i>V</i> <i>Q</i> <i>D</i> <i>Y</i> <i>H</i> <i>Y</i> <i>S</i> <i>G</i> <i>M</i> <i>D</i> <i>W</i> <i>G</i> <i>Q</i> GTTVTVSS

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están en negrita y cursiva, las regiones marco (FR) están en tipo simple. El orden de los elementos es: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

- 5 Se describen proteínas de unión al antígeno que contienen al menos una región variable de cadena pesada (VH) seleccionada del grupo que consiste en VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6, VH7, VH8, VH9, VH10, VH11, VH12 y VH13 y/o al menos una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en VL1, VL2, VL3, VL4, VL5, VL6 como se muestra en las TABLAS 1 y 2.
- 10 Cada una de las regiones variables de cadena pesada enumeradas en la TABLA 2 se puede combinar con cualquiera de las regiones variables de cadena ligera mostradas en la TABLA 1 para formar una proteína de unión al antígeno. En algunos casos, la proteína de unión al antígeno incluye al menos una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de las enumeradas en las TABLAS 1 y 2. En algunos casos, la proteína de unión al antígeno incluye al menos dos regiones variables de cadena pesada y/o regiones variables de
- 15 cadena ligera diferentes de las enumeradas en las TABLAS 1 y 2. Las diversas combinaciones de regiones variables de cadena pesada pueden combinarse con cualquiera de las diversas combinaciones de regiones variables de cadena ligera.
- En otros casos, la proteína de unión al antígeno contiene dos regiones variables idénticas de cadena ligera y/o dos
- 20 regiones variables de cadena pesada idénticas. Como ejemplo, la proteína de unión al antígeno puede ser un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional que comprende dos regiones variables de cadena ligera y dos regiones variables de cadena pesada en combinaciones de pares de regiones variables de cadena ligera y pares de regiones variables de cadena pesada enumeradas en las TABLAS 1 y 2. Los ejemplos de dichas proteínas de unión al antígeno que comprenden dos regiones variables de cadena pesada y cadena ligera idénticas incluyen:
- 25 Anticuerpo A VH2/VL1; Anticuerpo A1 VH1/VL1; Anticuerpo A2 VH3/VL1; Anticuerpo A3 VH4/VL1; Anticuerpo A4 VH5/VL1; Anticuerpo A5 VH6/VL1; Anticuerpo A6 VH7/VL1; Anticuerpo A7 VH8/VL1; Anticuerpo B VH9/VL2; Anticuerpo C VH10/VL3; Anticuerpo D VH11/VL4; Anticuerpo E VH12/VL5 y Anticuerpo F VH13/VL6.
- Algunas proteínas de unión a antígeno que se describen comprenden una región variable de cadena pesada y/o una
- 30 región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera seleccionada de las TABLAS 1 y 2 en solamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 31 o más residuos de aminoácidos, en donde cada una de dicha diferencia de secuencia de este tipo es independientemente una delección, inserción o sustitución de un aminoácido. Las regiones variables de cadena ligera y pesada, en algunas proteínas de unión al antígeno,
- 35 comprenden secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos proporcionadas en los TABLAS 1 y 2. Todavía otras proteínas de unión al antígeno, por ejemplo,

anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales, también incluyen formas de región de cadena pesada variante y/o formas de región de cadena ligera variante como se describe en el presente documento.

El término "identidad" se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más polinucleótidos, como se determina alineando y comparando las secuencias. "Porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas y se calcula basándose en el tamaño de la más pequeña de las moléculas que se comparan. Para estos cálculos, los huecos en alineaciones (de haberlos) deben abordarse por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, un "algoritmo"). Los métodos que se pueden utilizar para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos alineados incluyen los descritos en Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, Nueva York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, Nueva York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.), 1994, Nueva Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, Nueva York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, Nueva York: M. Stockton Press; y Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

En el cálculo del porcentaje de identidad, las secuencias que se comparan están alineadas de una manera que da la coincidencia más grande entre las secuencias. El programa informático utilizado para determinar el porcentaje de identidad es el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). El algoritmo informático GAP se utiliza para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se va a determinar el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias están alineadas para la adaptación óptima de su respectivo aminoácido o nucleótido (el "intervalo coincidente", según se determina por el algoritmo). Una penalización de apertura de hueco (que se calcula como 3x la diagonal promedio, en donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se utiliza; se usan la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada correspondencia aminoacídica perfecta por la matriz de comparación particular) y una penalización de extensión de hueco (que normalmente es 1/10 veces la penalización de apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62, junto con el algoritmo. En ciertos casos, también se usa por el algoritmo una matriz de comparación estándar (véase, Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62) por el algoritmo.

Los parámetros recomendados para determinar el porcentaje de identidad de polipéptidos o secuencias de nucleótidos utilizando el programa GAP son los siguientes: Algorithm: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453; Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, 1992, anteriormente; Penalización por huecos: 12 (pero sin penalización por huecos finales), Penalización por longitud de hueco: 4, Umbral de similitud: 0. Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado una coincidencia sólo de una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta a pesar de que no hay relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) se puede ajustar si se desea para dar como resultado un alineamiento que incluye al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Regiones determinantes de la complementariedad

Las regiones determinantes de la complementariedad o "CDR" están incrustadas dentro de un marco en las regiones variables de cadena pesada y ligera donde constituyen las regiones responsables de la unión y el reconocimiento del antígeno. Los dominios variables de las cadenas de inmunoglobulina de la misma especie, por ejemplo, presentan generalmente una estructura global similar; que comprende regiones de marco (FR) relativamente conservadas unidas por regiones CDR hipervariables. Una proteína de unión a antígeno puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más CDR. Las regiones variables analizadas anteriormente, por ejemplo, comprenden típicamente tres CDR. Las CDR de regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera están típicamente alineadas por las regiones de marco para formar una estructura que se une específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, CD30L). Desde N-terminal a C-terminal, las regiones variables de cadena ligera y pesada de origen natural típicamente se ajustan al siguiente orden de estos elementos: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones CDR y FR de dominios variables de cadenas ligeras y dominios variables de cadena pesada ejemplares se subrayan en las TABLAS 1 y 2. Se reconoce que los límites de las regiones CDR y FR pueden variar de los subrayados. Se han ideado sistemas de numeración para asignar números a aminoácidos que ocupan posiciones en cada uno de estos dominios. Las regiones determinantes de la complementariedad y las regiones marco de una proteína de unión al antígeno dada se pueden identificar utilizando estos sistemas. Los sistemas de numeración se

- definen en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación NIH N.º 91-3242, 1991, o Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 878-883. Otros sistemas de numeración para los aminoácidos en las cadenas de inmunoglobulina incluyen IMGT® (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics; Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 2005, 29: 185-203); y AHo (Honegger y Pluckthun, J. Mol. Biol. 2001, 309(3): 657-670). Las CDR proporcionadas en el presente documento pueden no sólo usarse para definir el dominio de unión al antígeno de una estructura de anticuerpo tradicional, sino que pueden estar incrustadas en una diversidad de otras estructuras polipeptídicas, como se describe en el presente documento.
- 10 Las proteínas de unión al antígeno descritas en el presente documento son polipéptidos en los que una o más CDR pueden injertarse, insertarse, incrustarse y/o unirse. Una proteína de unión al antígeno puede tener, por ejemplo, una CDR1 de cadena pesada ("CDRH1"), y/o una CDR2 de cadena pesada ("CDRH2"), y/o una CDR3 de cadena pesada ("CDRH3"), y/o una CDR1 de cadena ligera ("CDRL1"), y/o una CDR2 de cadena ligera ("CDRL2") y/o una CDR3 de cadena ligera ("CDRL3"). Algunas proteínas de unión al antígeno incluyen tanto una CDRH3 como una CDRL3. Los casos específicos utilizan generalmente combinaciones de CDR que no son repetitivas, por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno generalmente no se hacen con dos regiones CDRH2 en una región de cadena pesada variable, etc. Las proteínas de unión al antígeno pueden comprender una o más secuencias de aminoácidos que son idénticas a, o que difieren de las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR presentadas en la TABLA 3 en sólo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más residuos de aminoácidos, en donde cada una de dichas diferencias de secuencia es independientemente una deleción, inserción o sustitución de un aminoácido. Las CDR en algunas proteínas de unión a antígeno comprenden secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencias de CDR enumerada en la TABLA 3. En algunas proteínas de unión al antígeno, las CDR están incrustadas en una región "marco", que orienta la una o más CDR de tal manera que se consigan las propiedades de unión al antígeno apropiadas de la una o más CDR.

TABLA 3 Secuencias de región de cadena pesada variante ejemplares

SEQ ID NO:1	TGTSSDVGVYDYVS
SEQ ID NO:2	TGTSSDVGLYNYVS
SEQ ID NO:3	TGTSSDIGLYDYVS
SEQ ID NO:4	TGTSSDIGLYNYVS
SEQ ID NO:5	TGSSSDIGTYNYVS
SEQ ID NO:6	TGTSSDVGLYNYVS
SEQ ID NO:7	EVSNRPS
SEQ ID NO:8	EVNNRPS
SEQ ID NO:9	EVINRPS
SEQ ID NO:10	EVSKRPS
SEQ ID NO:11	SSYTSRSTWV
SEQ ID NO:12	SSYTSSTWV
SEQ ID NO:13	SSYSSSSTWV
SEQ ID NO:14	SYIWS
SEQ ID NO: 15	SYYWT
SEQ ID NO:16	SYSWS
SEQ ID NO:17	NNYWS
SEQ ID NO:18	SYYWS
SEQ ID NO:19	RIYASGNTNYNPSLKS
SEQ ID NO:20	RIYASGQTNYNPSLKS
SEQ ID NO:21	RIYTSGITNYNPSLKS
SEQ ID NO:22	RTSTSGRNINYNPSLKS
SEQ ID NO:23	RVYSSGLTNYKPSLKS
SEQ ID NO:24	RIFASGSTNYNPSLRS
SEQ ID NO:25	DYRVAGTYYYYYGLDV
SEQ ID NO:26	ERVVGASRYYYYYGVDV
SEQ ID NO:27	DFTIAARRYYYYGMDV
SEQ ID NO:28	ERATVTTRYHYDGMDV
SEQ ID NO:29	ERVGVQDYHHYSGMDV

Se describen en el presente documento regiones CDR1 que comprenden los residuos aminoacídicos 23-36 de SEQ

ID NOs: 36, 38, 40, 42 y 44; los residuos aminoacídicos 25-36 de SEQ ID NO:46 y los residuos aminoacídicos 31-35 de SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 y 72. Se describen las regiones CDR2 que comprenden los residuos aminoacídicos 52-58 de SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 42, 44 y 46, y los residuos aminoacídicos 50-65 de SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 y 72. Las regiones CDR3 comprenden los residuos aminoacídicos 91-100 de SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 42, 44 y 46, y los residuos aminoacídicos 98-113 de SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 y 72.

Las CDR divulgadas en el presente documento incluyen secuencias consenso derivadas de grupos de secuencias relacionadas. La secuencia consenso CDRL1 consiste en TGX1SSDX2GX3YX4YVS (SEQ ID NO:30) donde X1 es treonina o serina, X2 es valina o isoleucina, X3 es valina, treonina o leucina, y X4 es ácido aspártico o asparagina.

La secuencia consenso CDRL2 consiste en EVX1X2RPS (SEQ ID NO:31) en la que X1 es serina, asparagina o isoleucina y X2 es asparagina o lisina.

15 La secuencia consenso CDRL3 incluye SSYX1SX2STWV (SEQ ID NO:32) en la que X1 es treonina o serina y X2 es arginina o serina.

La secuencia consenso CDRH1 consiste en X1X2X3WX4 (SEQ ID NO:33) en la que X1 es serina o asparagina, X2 es tirosina o asparagina, X3 es isoleucina, tirosina o serina y X4 es treonina o serina. En un caso diferente, la secuencia consenso CDRH1 consiste en SYX3WX5 (SEQ ID NO:75) en la que X3 es I, S o Y y X5 es T o S.

La secuencia consenso CDRH2 consiste en RX1X2X3SGX4X5NYX6PSLX7S (SEQ ID NO:34) en la que X1 es isoleucina, valina o treonina, X2 es tirosina, fenilalanina, o serina, X3 es treonina, serina o alanina, X4 es isoleucina, leucina, asparagina, serina, arginina o glutamina, X5 es treonina o asparagina, X6 es asparagina o lisina y X7 es lisina o arginina.

La secuencia consenso CDRH3 consiste en X1X2X3X4X5X6X7X8YX9YX10GX11DV (SEQ ID NO:35) en la que X1 es ácido glutámico o ácido aspártico, X2 es arginina, tirosina o fenilalanina, X3 es valina, alanina, arginina o treonina, X4 es valina, treonina, glicina o isoleucina, X5 es valina, alanina o glicina, X6 es alanina, treonina, glicina, o glutamina, X7 es treonina, ácido aspártico, arginina o serina, X8 es arginina o tirosina, X9 es tirosina o histidina, X10 es tirosina, ácido aspártico o serina, y X11 es metionina, leucina o valina.

Anticuerpos monoclonales

35 Las proteínas de unión al antígeno que se describen incluyen anticuerpos monoclonales que se unen a CD30L. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, inmortalizando células esplénicas recolectadas del animal transgénico después de completar el programa de inmunización. Las células esplénicas se pueden inmortalizar utilizando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para su uso en procedimientos de fusión de producción de hibridomas son preferiblemente no productoras de anticuerpos, tienen alta eficiencia de fusión, y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solamente las células fusionadas deseadas (hibridomas). Los ejemplos de líneas celulares adecuadas para su uso en fusiones de ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XXO Bul; los ejemplos de líneas celulares usadas en fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

En algunos casos, se produce una línea celular de hibridoma mediante la inmunización de un animal (por ejemplo, un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno de CD30L; la recolección de células esplénicas del animal inmunizado; la fusión de las células esplénicas cosechadas a una línea celular de mieloma, generando de este modo células de hibridoma; establecimiento de líneas celulares de hibridoma a partir de las células de hibridoma, e identificación de una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido de CD30L. Dichas líneas celulares de hibridoma, y anticuerpos monoclonales anti-CD30L producidos por ellas, son aspectos de la presente solicitud.

Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma se pueden purificar utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Los hibridomas o los mAb se pueden cribar adicionalmente para identificar mAb con propiedades particulares, tales como la capacidad de reducir, inhibir, interferir con o modular la interacción de CD30L con CD30.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

También se proporcionan anticuerpos quiméricos y humanizados basados en las secuencias anteriores. Los anticuerpos monoclonales para su uso como agentes terapéuticos se pueden modificar de diversas maneras antes de su uso. Un ejemplo es un anticuerpo quimérico, que es un anticuerpo compuesto por segmentos de proteína de diferentes anticuerpos que están unidos covalentemente para producir cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulina funcionales o porciones inmunológicamente funcionales de los mismos. Generalmente, una porción de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos. Para métodos relacionados con anticuerpos quiméricos, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; y Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855. Se describe el injerto de CDR, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, y 5.530.101.

Un tipo útil de anticuerpo quimérico es un anticuerpo "humanizado". Generalmente, un anticuerpo humanizado se produce a partir de un anticuerpo monoclonal que surge inicialmente en un animal no humano. Ciertos residuos de aminoácidos en este anticuerpo monoclonal, típicamente de porciones que no reconocen el antígeno del anticuerpo, se modifican para que sean homólogos a los residuos correspondientes en un anticuerpo humano de isotipo correspondiente. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando diversos métodos sustituyendo al menos una porción de una región variable de roedor por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.585.089, y N.º 5.693.762; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536),

En ciertos casos, se pueden utilizar regiones constantes de especies distintas del ser humano junto con la región o regiones variables humanas para producir anticuerpos híbridos.

Anticuerpos completamente humanos

También se proporcionan anticuerpos totalmente humanos. Están disponibles métodos para fabricar anticuerpos completamente humanos específicos para un antígeno dado sin exponer a los seres humanos al antígeno ("anticuerpos completamente humanos"). Un medio específico proporcionado para implementar la producción de anticuerpos completamente humanos es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes Ig endógenos se han inactivado es un medio para producir anticuerpos monoclonales (mAb) completamente humanos en ratón, un animal que puede ser inmunizado con cualquier antígeno deseable. El uso de los anticuerpos completamente humanos puede minimizar las respuestas inmunógenas y alérgicas que a veces pueden causarse por la administración de mAb de ratón o derivados de ratón a seres humanos como agentes terapéuticos.

Se pueden producir anticuerpos completamente humanos mediante la inmunización de animales transgénicos (habitualmente ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Los antígenos para este fin tienen típicamente seis o más aminoácidos contiguos, y opcionalmente se conjugan con un vehículo, tal como un hapteno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; y Bruggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7:33. En un ejemplo de tal método, los animales transgénicos se producen incapacitando los loci de inmunoglobulina de ratón endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera de ratón, e insertando en el genoma de ratón grandes fragmentos de ADN de genoma humano que contienen loci que codifican proteínas de cadena pesada y ligera humanas. Los animales parcialmente modificados, que tienen menos que el complemento completo de loci de inmunoglobulina humana, se cruzan entonces para obtener un animal que tenga todas las modificaciones del sistema inmune deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos que son inmunoespecíficos para el inmunógeno, pero tienen secuencias de aminoácidos humanas en lugar de murinas, incluyendo las regiones variables. Para más detalles de dichos métodos, véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de la OMPI WO96/33735 y WO94/02602. Se describen métodos adicionales relacionados con ratones transgénicos para fabricar anticuerpos humanos en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.545.807; 6.713.610; 6.673.986; 6.162.963; 5.545.807; 6.300.129; 6.255.458; 5.877.397; 5.874.299 y 5.545.806; en las publicaciones de patente de la OMPI WO91/10741, WO90/04036, y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1.

Los ratones transgénicos descritos anteriormente contienen un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ($[\mu]$ y $[\gamma]$) y ligera $[\kappa]$ humanas no transpuestas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena $[\mu]$ y $[\kappa]$ endógenos (Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM de ratón o $[\kappa]$ y en respuesta a la inmunización, y los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG $[\kappa]$ humanos de alta afinidad (Lonberg et al., anteriormente; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación de tales ratones se describe en detalle en Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon et al., 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-85. Véanse adicionalmente las Patentes de Estados Unidos N.º 5.545.806; N.º 5.569.825; N.º 5.625.126; N.º 5.633.425; N.º 5.789.650; N.º 5.877.397; N.º 5.661.016; N.º 5.814.318; N.º 5.874.299; y N.º 5.770.429; así como la Patente de Estados Unidos N.º 5.545.807; las Publicaciones de la OMPI N.º WO 93/1227; WO 92/22646; y WO 92/03918. Las tecnologías utilizadas para producir anticuerpos humanos en estos ratones transgénicos se describen también en la Publicación de la OMPI N.º WO 98/24893, y Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146-156. Por ejemplo, las cepas de ratones transgénicos HCo7 y HCo12 se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-CD30L.

Utilizando tecnología de hibridoma, se pueden producir mAAb humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada y seleccionarse a partir de ratones transgénicos tales como los descritos anteriormente. Dichos anticuerpos se pueden clonar y expresar utilizando un vector adecuado y una célula huésped, o los anticuerpos pueden recogerse a partir de células de hibridoma cultivadas.

Los anticuerpos completamente humanos también se pueden derivar de bibliotecas de expresión en fagos (como se divulga en Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Publicación de la OMPI N.º WO 99/10494). Las técnicas de expresión en fagos imitan la selección inmune a través de la presentación de repertorios de anticuerpos sobre la superficie del bacteriófago filamentoso, y la posterior selección de fago por su unión a un antígeno de elección.

Proteínas de unión a antígeno bifuncionales o biespecíficas

Una proteína o anticuerpo de unión a antígeno "biespecífico", "específico dual" o "bifuncional" es una proteína o anticuerpo de unión a antígeno híbrido, respectivamente, que tiene dos sitios de unión a antígeno diferentes, tales como una o más CDR o una o más regiones variables como se ha descrito anteriormente. En algunos casos son un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. La proteína de unión a antígeno multiespecífica o "anticuerpo multiespecífico" es uno que se dirige a más de un antígeno o epítipo. Las proteínas y anticuerpos de unión a antígeno biespecíficos son una especie de la proteína o anticuerpo de unión al antígeno multiespecífico y se pueden producir mediante una diversidad de métodos incluyendo, pero sin limitación, la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553].

Fragmentos inmunológicos

Las proteínas de unión al antígeno también incluyen fragmentos inmunológicos de un anticuerpo (por ejemplo, un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$, o un scFv). Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera (la región variable de cadena ligera (V_L) y su correspondiente dominio constante (C_L)) y una cadena pesada (la región variable de cadena pesada (V_H) y el primer dominio constante (C_{H1})). La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que también contiene la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2} , de manera que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula $F(ab')_2$. Por lo tanto, un "fragmento $F(ab')_2$ " está compuesto por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Un "fragmento Fv" consiste en la región de cadena ligera variable y la región de cadena pesada variable de un solo brazo de un anticuerpo. Los anticuerpos monocatenarios "scFv" son moléculas Fv en las que las regiones variables de cadena pesada y ligera se han conectado por un enlazador flexible para formar una única cadena polipeptídica, que forma una región de unión al antígeno. Los anticuerpos monocatenarios se analizan en detalle en la Publicación de la OMPI N.º WO 88/01649, la Patente de Estados Unidos N.º 4.946.778 y N.º 5.260.203; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. 85: 5879; Ward et al., 1989, Nature 334: 544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-387; Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108 y Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40. Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_{H1} y C_{H2} de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por dos o más enlaces disulfuro y por 5 interacciones hidrófobas de los dominios C_{H3}.

También se incluyen anticuerpos de dominio, fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales que contienen solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H están unidas covalentemente con un enlazador peptídico para crear un anticuerpo de 10 dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente se puede dirigir a los mismos o diferentes antígenos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas de polipéptidos, en los que cada cadena polipeptídica comprende dominios V_H y V_L unidos por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, permitiendo así que cada dominio se empareje con un dominio complementario en otra cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, Holliger et al., Proc. 15 Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993 y Poljak et al., Structure 2:1121-23, 1994). De forma similar, los tricuerpos y tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión al antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes. Los maxicuerpos comprenden scFv bivalentes unidos covalentemente a la región Fc de IgG₁, (véase, por ejemplo, Fredericks et al, 2004, Protein Engineering, Design & Selection, 17:95-106; Powers et al., 2001, Journal of Immunological Methods, 20 251:123-135; Shu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; Hayden et al., 1994, Therapeutic Immunology 1:3-15).

Diversas formas diferentes

25 También se describen formas variantes de las proteínas de unión al antígeno descritas anteriormente, teniendo algunas de las proteínas de unión al antígeno, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en una o más de las cadenas pesadas o ligeras, regiones variables o CDR enumeradas en las TABLAS 1 y 2.

Los aminoácidos de origen natural se pueden dividir en clases basadas en propiedades comunes de la cadena 30 lateral: hidrófobos (norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile); hidrófilos neutros (Cys, Ser, Thr, Asn, Gln); ácido (Asp, Glu); básicos (His, Lys, Arg); residuos que influyen en la orientación de la cadena (Gly, Pro); y aromáticos (Trp, Tyr, Phe).

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas 35 clases con otro miembro de la misma clase. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden incluir residuos de aminoácidos de origen no natural, que se incorporan típicamente por síntesis de péptidos químicos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas invertidas de restos de aminoácidos. Dichas modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o bioquímicas de las proteínas de unión al antígeno descritas en el presente documento se pueden lograr creando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) 40 la estructura del esqueleto molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en forma de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de las clases anteriores 45 por un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos se pueden introducir en regiones del anticuerpo que son homólogas con anticuerpos humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al realizar tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. El perfil hidropático de una 50 proteína se calcula asignando a cada aminoácido un valor numérico ("índice de hidropatía") y luego promediando repetidamente estos valores a lo largo de la cadena peptídica. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad y carga. Son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

55 La importancia del perfil hidropático en conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-131). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y que conservan todavía una actividad biológica similar. Al realizar cambios basados en el índice hidropático, en ciertos casos, se incluye la

sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En algunos casos, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en otros casos, se incluyen los que están dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente basándose en la hidrofiliidad, en particular cuando la proteína o péptido biológicamente funcional creado de este modo está destinado a su uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En ciertos casos, la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, según se rige por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y la unión al antígeno o inmunogenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1 glutamato (+3,0 \pm 1 serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1 alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, en ciertos casos, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , en otros casos, se incluyen aquellos que están dentro de ± 1 , y aún en otros casos, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$. En algunos casos, también se pueden identificar epítomos de las secuencias de aminoácidos primarios en base a la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan "regiones de núcleo epitópicas".

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos ejemplares se exponen en la TABLA 4.

TABLA 4

Sustituciones de aminoácidos conservadoras							
Residuo	Sub	Residuo	Sub	Residuo	Sub	Residuo	Sub
Ala	Ser	Gln	Asn	Leu	Ile, Val	Thr	Ser
Arg	Lys	Glu	Asp	Lys	Arg, Gln, Glu	Trp	Tyr
Asn	Gln, His	Gly	Pro	Met	Leu, Ile	Tyr	Trp, Phe
Asp	Glu	His	Asn, Gln	Phe	Met, Leu, Tyr	Val	Ile, Leu
Cys	Ser	Ile	Leu, Val	Ser	Thr	Thr	Ser
Residuo = Residuo original Sub = Sustitución ejemplar							

Un experto será capaz de determinar variantes adecuadas de polipéptidos como se expone en el presente documento utilizando técnicas bien conocidas. Un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad dirigiéndose a regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. El experto en la técnica también será capaz de identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En casos adicionales, incluso áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sometidas a sustituciones de aminoácidos conservadoras sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de la función de la estructura que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a residuos de aminoácidos importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes predichos.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un experto en la técnica puede predecir el alineamiento de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la técnica puede optar por no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos que se predijo que estaban sobre la superficie de la proteína, ya que dichos residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contengan una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Estas variantes pueden seleccionarse entonces usando ensayos para la actividad de CD30L, (véase la sección de Ejemplos a continuación), proporcionando de este modo información con respecto a qué aminoácidos pueden cambiarse y cuáles no deben cambiarse. En otras palabras, basándose en la información obtenida a partir de dichos experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las posiciones aminoácidas donde se deben evitar sustituciones adicionales en solitario o junto con otras mutaciones.

Se han dedicado varias publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véanse, Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou et al., 1974, *Biochem.* 13:222-245; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou et al., 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 5 47:251-276; y Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26: 367-384. Además, actualmente están disponibles programas informáticos para facilitar la predicción de la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelo de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia superior al 30 %, o una similitud superior al 40 %, a menudo tienen topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado una mejor predictibilidad 10 de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Véase, Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247]. Se ha sugerido (Brenner et al., 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376) que hay un número limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dado, y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural será drásticamente más precisa.

15 Los métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen "enroscamiento" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-387; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15-19), "análisis de perfil" (Bowie et al., 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov et al., 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358), y "enlace evolutivo" (Véase, Holm, 1999, anteriormente; y Brenner, 1997, anteriormente).

20 En algunos casos, se hacen sustituciones de aminoácidos que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión a ligando o antígeno, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales sobre dichos polipéptidos, tales como el mantenimiento de la estructura del esqueleto molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal; el mantenimiento o alteración de 25 la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o el mantenimiento o alteración del volumen de una cadena lateral.

Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (en ciertas realizaciones, sustituciones conservadoras de aminoácidos) en la secuencia de origen natural. Se pueden hacer sustituciones en la 30 porción del anticuerpo que está fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). En dichos casos, se pueden usar sustituciones de aminoácidos conservadoras que no cambien sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, uno o más aminoácidos de reemplazo que no alteran la estructura secundaria que caracteriza a la proteína de unión al antígeno parental o nativa). Los ejemplos de estructuras de polipéptidos secundarias y terciarias reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Nueva York: Freeman and Company; *Introduction to Protein Structure* (Branden y Tooze, eds.), 1991, Nueva York: Garland Publishing; y Thornton et al., 1991, *Nature* 354:105. 35

Otras variantes incluyen variantes de cisteína en las que uno o más residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos parental o nativa se suprimen o se sustituyen con otro aminoácido (por ejemplo, serina). Las variantes de cisteína son útiles, entre otros, cuando deben replegarse anticuerpos (por ejemplo) en una conformación biológicamente activa. Las variantes de cisteína pueden tener menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de las cisteínas no emparejadas. 40

45 La región variable de la cadena pesada y ligera y las CDR que se divulgan se pueden utilizar para preparar proteínas de unión a antígeno que contienen una región de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un polipéptido CD30L. "Región de unión a antígeno" significa una proteína o una porción de una proteína que se une específicamente a un antígeno especificado, tal como la región que contiene los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren a la proteína de unión a antígeno su especificidad y afinidad por el antígeno 50 diana. Una región de unión al antígeno puede incluir una o más CDR y ciertas regiones de unión al antígeno también incluyen una o más regiones "marco". Por ejemplo, una o más de las CDR enumeradas en la TABLA 3 se pueden incorporar en una molécula (por ejemplo, un polipéptido) de forma covalente o no covalente para realizar una inmunoadhesión. Una inmunoadhesión puede incorporar la una o más CDR como parte de una cadena polipeptídica mayor, puede unir covalentemente la una o más CDR a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar la una o más 55 CDR no covalentemente. La una o más CDR permiten que la inmunoadhesión se una específicamente a un antígeno particular de interés (por ejemplo, un polipéptido CD30L).

Otras proteínas de unión al antígeno incluyen miméticos (por ejemplo, "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos") basados en las regiones variables y las CDR que se describen en el presente documento. Estos análogos pueden

ser péptidos, no péptidos o combinaciones de regiones peptídicas y no pépticas. Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15:29; Veber y Freidinger, 1985, TINS p. 392; y Evans et al., 1987, J. Med. Chem. 30:1229. Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Dichos compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular computarizado. Generalmente, los peptidomiméticos son proteínas que son estructuralmente similares a una proteína de unión al antígeno que presenta una actividad biológica deseada, tal como la capacidad para unirse o bloquear la interacción de CD30 y CD30L, pero los peptidomiméticos tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado de, por ejemplo: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH-CH-(cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, por métodos ya conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, se puede usar sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina), para generar proteínas más estables. Además, se pueden generar péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387), por ejemplo, añadiendo residuos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

También se proporcionan derivados de las proteínas de unión al antígeno que se describen en el presente documento. Las proteínas derivadas de unión al antígeno pueden comprender cualquier molécula o sustancia que imparta una propiedad deseada a la proteína o fragmento de unión a antígeno, tal como una semivida aumentada en un uso particular. La proteína de unión a antígeno derivada puede comprender, por ejemplo, un resto detectable (o marcado) (por ejemplo, una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, una microesfera detectable (tal como una microesfera magnética o electrodensa (por ejemplo, microesfera de oro), o una molécula que se une a otra molécula (por ejemplo, biotina o estreptavidina)), un resto terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, un resto radioactivo, citotóxico o farmacéuticamente activo), o una molécula que aumenta la idoneidad de la proteína de unión a antígeno para un uso particular (por ejemplo, administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos *in vivo* o *in vitro*). Los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar para derivar una proteína de unión a antígeno incluyen albúmina (por ejemplo, albúmina sérica bovina humana) y polietilenglicol (PEG). Los derivados unidos a albúmina y PEGilados de proteínas de unión a antígeno se pueden preparar utilizando técnicas ya conocidas en la técnica. En un caso, la proteína de unión al antígeno está conjugada o unida de otro modo a transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR puede ser modificada químicamente con, por ejemplo, un producto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxitilados y alcoholes polivinílicos.

Otros derivados incluyen conjugados covalentes o agregados de proteínas de unión al antígeno CD30L con otras proteínas o polipéptidos, tales como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al extremo N o extremo C de una proteína de unión al antígeno CD30L. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal heterólogo (o líder), por ejemplo, el líder de factor alfa de levadura, o un péptido tal como una etiqueta de epítipo. Las proteínas de fusión que contienen proteína de unión al antígeno CD30L pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de la proteína de unión al antígeno CD30L (por ejemplo, poli-His). Una proteína de unión al antígeno CD30L también se puede unir al péptido FLAG como se describe en Hopp et al., 1988, Bio/Technology 6:1204; y la Patente de Estados Unidos N.º 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico (mAb), lo que permite un ensayo rápido y una purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que el péptido FLAG se fusiona a un polipéptido dado están comercialmente disponibles (Sigma, St. Louis, MO).

Los oligómeros que contienen una o más proteínas de unión al antígeno CD30L se pueden emplear como antagonistas de CD30L. Los oligómeros pueden estar en forma de dímeros, trímeros u oligómeros superiores unidos covalentemente o no unidos covalentemente. Se contemplan oligómeros que comprenden dos o más proteínas de unión al antígeno CD30L para su uso, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc. También se incluyen oligómeros que comprenden múltiples proteínas de unión a CD30L unidas a través de interacciones covalentes o no covalentes entre restos peptídicos fusionados con las proteínas de unión al antígeno CD30L. Dichos péptidos pueden ser enlazadores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Entre los enlazadores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.751.180 y 4.935.233. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de los anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de proteínas de unión al antígeno CD30L unidas a los mismos. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina apropiados para producir proteínas oligoméricas solubles se

describen en la Publicación de la OMPI N.º WO 94/10308; Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191; y Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-278. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento de proteína de unión al antígeno CD30L o derivado fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresan en células huésped apropiadas, y los fragmentos o derivados de la proteína de unión al antígeno CD30L oligoméricos solubles que se forman se recuperan del sobrenadante de cultivo.

Dichos oligómeros pueden comprender de dos a cuatro proteínas de unión al antígeno CD30L. Los restos de proteína de unión al antígeno CD30L del oligómero pueden estar en cualquiera de las formas descritas anteriormente, por ejemplo, variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden proteínas de unión al antígeno CD30L que tienen actividad de unión a CD30L. Los oligómeros se pueden preparar usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de los anticuerpos (incluyendo el dominio Fc) se ha descrito, por ejemplo, por Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11.

También se incluyen dímeros que comprenden dos proteínas de fusión creadas por fusión de una proteína de unión al antígeno CD30L con la región Fc de un anticuerpo. El dímero se puede fabricar, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble como moléculas de anticuerpo, después de lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los restos Fc para producir el dímero. Dichos polipéptidos Fc incluyen formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. Se incluyen también formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de ellas) ofrecen la ventaja de una purificación fácil mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A o proteína G. Un polipéptido Fc apropiado, descrito en la Publicación de la OMPI N.º WO 93/10151 y las Patentes de Estados Unidos N.º 5.426.048 y 5.262.522, es un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región bisagra N-terminal al extremo C-terminal nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 5.457.035, y en Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en la publicación de la OMPI N.º WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína presente una afinidad reducida por los receptores Fc.

35 Glucosilación

La proteína de unión al antígeno puede tener un patrón de glucosilación que es diferente o alterado del que se encuentra en la especie nativa. Como es conocido en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos particulares de glucosilación, analizados más adelante), como de la célula o el organismo huésped en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se analizan a continuación.

La glucosilación de polipéptidos está típicamente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tri-péptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tri-péptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, mucho más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación a la proteína de unión al antígeno se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias tri-péptido descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina con respecto a la secuencia de partida (para sitios de glucosilación unidos a O). Para que sea más fácil, la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al antígeno puede alterarse a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de tal manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar el número de restos carbohidrato en la proteína de unión al antígeno es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tiene capacidades de glucosilación para la glucosilación unida a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en la Publicación PCT N.º WO 87/05330, y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306.

10

La eliminación de restos carbohidrato presentes en la proteína de unión al antígeno de partida se puede realizar química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el polipéptido. La desglucosilación química se describe por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos carbohidrato sobre polipéptidos se puede conseguir mediante el uso de una diversidad de endo y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glucosilación en sitios potenciales de glucosilación se puede evitar mediante el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces de proteína N-glucósido.

Por lo tanto, se contemplan variantes de glucosilación de las proteínas de unión al antígeno en las que el número y/o el tipo de sitios de glucosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido parental. En ciertos casos, las variantes de la proteína de unión al antígeno comprenden un mayor o menor número de sitios de glucosilación unidos a N que el polipéptido parental. Las sustituciones que eliminan o alteran esta secuencia impedirán la adición de una cadena de carbohidrato unida a N presente en el polipéptido parental. Por ejemplo, la glucosilación se puede reducir mediante la delección de un Asn o sustituyendo Asn por un aminoácido diferente. Los anticuerpos tienen típicamente un sitio de glucosilación unido a N en la región Fc.

30 Marcadores y grupos efectores

Las proteínas de unión al antígeno pueden comprender uno o más marcadores. El término "marcador" o "grupo marcador" se refiere a cualquier marcador detectable. En general, los marcadores están en una diversidad variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; c) tintes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítomo, etc.). En algunos casos, el grupo marcador se acopla a la proteína de unión al antígeno a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen diversos métodos para etiquetar proteínas. Los ejemplos de grupos marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (por ejemplo FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos de biotínulo, o epítomos polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomo). En algunos casos, el grupo marcador se acopla a la proteína de unión al antígeno a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen diversos métodos para marcar proteínas y pueden utilizarse según se considere apropiado.

El término "grupo efector" significa cualquier grupo acoplado a una proteína de unión al antígeno que actúa como un agente citotóxico. Los ejemplos de grupos efectores apropiados son radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I). Otros grupos apropiados incluyen toxinas, grupos terapéuticos o grupos quimioterapéuticos. Ejemplos de grupos adecuados incluyen caliqueamicina, auristatina, geldanamicina y maytansina. En algunos casos, el grupo efector se acopla a la proteína de unión al antígeno a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Polinucleótidos que codifican proteínas de unión a antígeno CD30L

También se describen polinucleótidos que codifican las proteínas de unión al antígeno descritas en el presente documento, o porciones de las mismas, incluyendo polinucleótidos que codifican una o ambas cadenas de un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína o variante de los mismos, polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada o solamente CDR, polinucleótidos suficientes para su uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, y secuencias complementarias de lo anterior. Los polinucleótidos pueden tener cualquier longitud. Pueden tener, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 85, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1.000, 1.500, 3.000, 5.000 o más ácidos nucleicos de longitud, incluyendo todos los valores intermedios, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o ser parte de un polinucleótido más grande, por ejemplo, un vector. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender ácidos nucleicos de ARN y/o ADN y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos).

Los polinucleótidos que codifican ciertas proteínas de unión al antígeno, o porciones de las mismas (por ejemplo, anticuerpo de longitud completa, cadena pesada o ligera, dominio variable, o una CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3) se pueden aislar a partir de linfocitos B de ratones que se han inmunizado con CD30L o un fragmento inmunógeno del mismo. El polinucleótido se puede aislar mediante procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La expresión en fagos es otro ejemplo de una técnica conocida por la que se pueden preparar derivados de los anticuerpos y otras proteínas de unión al antígeno. En un enfoque, los polipéptidos que son componentes de una proteína de unión al antígeno de interés se expresan en cualquier sistema de expresión recombinante apropiado, y se permite que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar moléculas de proteína de unión al antígeno. La presentación en fagos también se utiliza para derivar proteínas de unión al antígeno que tienen propiedades diferentes (es decir, afinidades variables para el antígeno al que se unen) a través del intercambio de cadenas, véase Marks et al., 1992, *BioTechnology* 10: 779.

Debido a la degeneración del código genético, cada una de las secuencias de polipéptidos representadas en el presente documento también están codificadas por un gran número de otras secuencias polinucleotídicas además de las descritas. Por ejemplo, los dominios variables de cadena pesada descritos en el presente documento pueden codificarse por las secuencias de polinucleótidos SEQ ID NOs: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73. Los dominios variables de cadena ligera se pueden codificar por las secuencias de polinucleótidos SEQ ID NOs: 37, 39, 41, 43, 45, y 47. Por lo tanto, un experto en la técnica apreciará que la presente solicitud proporciona una descripción y habilitación escrita adecuada para cada secuencia de nucleótidos degenerada que codifica cada proteína de unión a antígeno.

También se describen polinucleótidos que se hibridan con otras moléculas polinucleotídicas en condiciones de hibridación particulares. Los métodos para hibridar ácidos nucleicos, parámetros básicos que afectan a la elección de las condiciones de hibridación y la orientación para idear condiciones adecuadas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc.). Como se define en el presente documento, una condición de hibridación moderadamente rigurosa utiliza una solución de prelavado que contiene 5x cloruro sódico/citrato sódico (SSC), SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de formamida aproximadamente al 50 %, 6x SSC y una temperatura de hibridación de 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tal como una que contiene aproximadamente el 50 % de formamida, con una temperatura de hibridación de 42 °C), y condiciones de lavado de 60 °C, en 0,5x SSC, SDS al 0,1 %. Una condición de hibridación rigurosa hibrida en 6x SSC a 45 °C seguido de uno o más lavados en 0,1x SSC, SDS al 0,2 % a 68 °C. Además, un experto en la técnica puede manipular la hibridación y/o las condiciones de lavado para aumentar o disminuir la rigurosidad de la hibridación de tal manera que los polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que son al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % idénticos entre sí, incluyendo todos los valores intermedios, típicamente permanecen hibridados entre sí.

Se pueden introducir cambios por mutación en un polinucleótido, lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión al antígeno o un derivado de la proteína de unión al antígeno) que codifica. Las mutaciones se pueden introducir utilizando cualquier técnica conocida en la técnica, tal como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis aleatoria. Los polipéptidos mutantes se pueden expresar y seleccionar según una propiedad deseada. Las mutaciones se pueden introducir en un polinucleótido sin alterar

significativamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, sustituciones en residuos de aminoácidos no esenciales. Como alternativa, se pueden introducir una o más mutaciones en un polinucleótido que cambia selectivamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, la mutación puede modificar cuantitativa o cualitativamente la actividad biológica, tal como aumentar, reducir o eliminar la actividad y 5 cambiar la especificidad antigénica de una proteína de unión al antígeno.

También se describen polinucleótidos que son adecuados para su uso como cebadores o sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico. Un polinucleótido puede comprender solamente una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa, por ejemplo, un fragmento que 10 puede usarse como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción activa (por ejemplo, una porción de unión a CD30L) de un polipéptido. Se pueden usar sondas basadas en la secuencia de un ácido nucleico para detectar el ácido nucleico o ácidos nucleicos similares, por ejemplo, transcripciones que codifican un polipéptido. La sonda puede comprender un grupo marcador, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas se pueden usar para identificar una célula que expresa el polipéptido.

15

Métodos de expresión de proteínas de unión a antígeno

Las proteínas de unión al antígeno descritas en el presente documento se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno CD30L se pueden producir 20 mediante sistemas de expresión recombinantes, utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al.(eds.) Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

También se describen en el presente documento sistemas y construcciones de expresión en forma de plásmidos, vectores de expresión, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se ha descrito anteriormente, así como células huésped que comprenden dichos sistemas o construcciones de expresión. Como se usa en el presente documento, "vector" significa cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) adecuada para su uso para transferir información codificante de proteína a una célula 30 huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores virales, vectores de mamífero no episómicos y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes. Los vectores de expresión, tales como vectores de expresión recombinantes, son útiles para la transformación de una célula huésped y contienen secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula huésped) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas operativamente a la misma. Una construcción de expresión puede incluir, pero sin limitación, secuencias que afectan o controlan la transcripción, traducción y, si los intrones están presentes, afectan al corte y empalme de ARN de una región codificante unida operativamente a la misma. "Unido operativamente" significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que les permite realizar sus funciones inherentes. Por ejemplo, una secuencia de control, por ejemplo, un promotor, en un vector que está "unido operativamente" a una secuencia codificante de proteína, se dispone de tal forma que 40 la actividad normal de la secuencia de control conduce a la transcripción de la secuencia codificante de la proteína que da como resultado la expresión recombinante de la proteína codificada.

También se describen células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión, tal como un vector de expresión recombinante. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o célula 45 eucariota (por ejemplo, células de levadura, insectos o mamíferos (por ejemplo, células CHO)). El ADN vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas a través de técnicas convencionales de transformación o transfección. Para una transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a los antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped 50 junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el polinucleótido introducido pueden identificarse mediante selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren), entre otros 55 métodos.

Las proteínas de unión al antígeno se pueden expresar en líneas celulares de hibridoma (por ejemplo, en particular los anticuerpos se pueden expresar en hibridomas) o en líneas celulares distintas de los hibridomas. Las construcciones de expresión que codifican las proteínas de unión al antígeno se pueden utilizar para transformar una

célula huésped de mamífero, insecto o microbiana. La transformación se puede realizar utilizando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, empaquetado del polinucleótido en un virus o bacteriófago y la transducción de una célula huésped con la construcción por procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ilustra por las Patentes de Estados Unidos N.º 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461; 4.959.455. El procedimiento de transformación óptimo utilizado dependerá del tipo de célula huésped que se esté transformando. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de uno o más polinucleótidos en liposomas, mezcla de ácido nucleico con lípidos cargados positivamente, y microinyección directa del ADN en núcleos.

Las construcciones de expresión recombinantes típicamente comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido. El polipéptido puede comprender uno o más de los siguientes: una o más CDR tal como se describe en el presente documento; una región variable de cadena ligera; una región variable de cadena pesada; una región constante de cadena ligera; una región constante de cadena pesada (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2} y/o C_{H3}); y/o otra porción de supercóntigo de una proteína de unión al antígeno CD30L. Estas secuencias de ácido nucleico se insertan en un vector de expresión apropiado utilizando técnicas de unión estándar. En un caso, la región constante de cadena pesada o ligera se adjunta al extremo C de una región variable de cadena pesada o ligera que se describe en el presente documento y se liga a un vector de expresión. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped, permitiendo que se produzca la amplificación y/o expresión del gen). En algunas realizaciones, se usan vectores que emplean ensayos de complementación de fragmentos de proteínas utilizando indicadores de proteínas, tales como dihidrofolato reductasa (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 6.270.964). Los vectores de expresión adecuados se pueden adquirir, por ejemplo, en Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) o BD Biosciences (San Jose, CA). Otros vectores útiles para clonar y expresar los anticuerpos y fragmentos incluyen los descritos en Bianchi y McGrew, 2003, *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439-44]. Se analizan vectores de expresión adecuados adicionales, por ejemplo, en *Methods Enzymol.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, Nueva York: Academic Press.

Típicamente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, denominadas colectivamente como "secuencias flanqueantes" en ciertos casos, incluirán típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia de intrones completa que contiene un sitio de corte y empalme de donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción de un polipéptido, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polienlazador para insertar el polinucleótido que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador seleccionable. Los vectores de expresión que se describen pueden construirse a partir de un vector de partida tal como un vector comercialmente disponible. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento ya no están presentes en el vector, se pueden obtener individualmente y ligarse al vector. Los métodos utilizados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes se conocen bien por un experto en la técnica.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido situada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante de la proteína de unión al antígeno CD30L; la secuencia oligonucleotídica codifica poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG®, HA (virus de influenza de hemaglutinina) o myc, para los que existen anticuerpos disponibles en el mercado. Esta etiqueta se fusiona típicamente al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como un medio para la purificación por afinidad o la detección de la proteína de unión al antígeno CD30L desde la célula huésped. La purificación por afinidad puede realizarse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna utilizando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente de la proteína de unión al antígeno CD30L purificada por diversos medios tales como el uso de ciertas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procarionta o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional y pueda ser activada por la maquinaria de la célula huésped.

- Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores se pueden obtener por cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento se han identificado previamente por cartografía y/o por digestión con endonucleasas de restricción y, por lo tanto, pueden
- 5 aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia completa de nucleótidos de una secuencia flanqueante. Aquí, la secuencia flanqueante se puede sintetizar usando los métodos descritos en el presente documento para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.
- 10 Si se conoce toda o sólo una porción de la secuencia flanqueante, se puede obtener utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o por cribado de una genoteca con una sonda adecuada, tal como un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante de la misma u otra especie. Cuando la secuencia flanqueante no se conoce, se puede aislar un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante a partir de una pieza de ADN más grande que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento se
- 15 puede realizar mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido de aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Qiagen, Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para lograr este propósito será fácilmente evidente para un experto en la técnica.
- 20 Un origen de replicación es típicamente una parte de aquellos vectores de expresión procariotas adquiridos en el mercado, y el origen ayuda a la amplificación del vector en una célula huésped. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, se puede sintetizar químicamente basándose en una secuencia conocida y se liga en el vector. Por ejemplo, el origen de la replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, y son útiles diversos orígenes virales (por ejemplo,
- 25 SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o virus del papiloma tales como HPV o BPV) para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (por ejemplo, el origen de SV40 se utiliza a menudo sólo porque contiene también el promotor temprano del virus).
- 30 Una secuencia de terminación de la transcripción se encuentra típicamente 3' con respecto al extremo de una región codificante de polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente desde una biblioteca o incluso se adquiere en el mercado como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los descritos
- 35 en el presente documento.
- Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para
- 40 células huésped procariotas; (b) complementan deficiencias auxótrofas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos o definidos. Los marcadores seleccionables específicos son el gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina, y el gen de resistencia a la tetraciclina. Ventajosamente, también se puede usar un gen de resistencia a la neomicina para la selección tanto en células huésped procariotas como eucariotas.
- 45 Se pueden usar otros genes seleccionables para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en el que los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de las sucesivas generaciones de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables apropiados para células de mamífero incluyen
- 50 dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes de timidina cinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamífero se colocan a presión de selección en donde sólo los transformantes están adaptados de forma única para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se aumenta sucesivamente, conduciendo de este modo a la amplificación tanto del gen seleccionable como del ADN que codifica
- 55 otro gen, tal como una proteína de unión al antígeno que se une a CD30L. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de un polipéptido tal como una proteína de unión al antígeno a partir del ADN amplificado.

Un sitio de unión al ribosoma es normalmente necesario para la iniciación de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento

se encuentra típicamente 3' con respecto al promotor y 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar.

En algunos casos, tal como cuando se desea la glucosilación en un sistema de expresión de células huésped eucarióticas, se pueden manipular las diversas pre o pro-secuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal particular, o añadir prosecuencias, que también pueden afectar a la glucosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales incidentales a la expresión, que pueden no haber sido totalmente eliminados. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos residuos de aminoácidos encontrados en el sitio de escisión de la peptidasa, unido al extremo amino. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar lugar a una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

La expresión y la clonación contendrán típicamente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y unido operativamente a la molécula que codifica una proteína de unión al antígeno CD30L. Los promotores son secuencias no transcritas situadas aguas arriba (es decir, 5') con respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, transcriben uniformemente un gen al que están unidos operativamente, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conocen bien un gran número de promotores, reconocidos por una diversidad de potenciales células huésped. Un promotor apropiado está unido operativamente al ADN que codifica una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera de una proteína de unión al antígeno CD30L eliminando el promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes de levadura también se conocen bien en la técnica. Los potenciadores de la levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero se conocen bien e incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B, y virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero sin limitación: promotor temprano SV40 (Benoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); promotor de CMV (Thomsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); promotor de la timidina cinasa del herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); promotor y secuencias reguladoras del gen metalotionina (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 21-25). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción animal, que presentan especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes y Devel.* 1 :268-276); la región de control del gen de la alfa-feto-proteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); la región de control del gen de la alfa-1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes y Devel.* 1:161-171); la región de control del gen de la beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activa en células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); la región de control del gen de cadena ligera de la miosina 2 que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Una secuencia potenciadora se puede insertar en el vector para aumentar la transcripción por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, normalmente de de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son de orientación y posición relativamente independiente, habiéndose encontrado en posiciones tanto 5' como 3' con respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles a partir de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usa un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucariotas. Mientras que un potenciador se puede situar en el vector ya sea 5' o 3' con respecto a una secuencia codificante, se encuentra típicamente en un sitio 5' del promotor. Una secuencia que codifica una secuencia señal nativa o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido señal) se puede incorporar en un vector de expresión, para promover la secreción extracelular del anticuerpo. La elección del péptido señal o líder depende del tipo de células huésped en las que se va a producir el anticuerpo, y una secuencia señal heteróloga puede reemplazar a la secuencia señal nativa. Los ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células huésped de mamíferos incluyen los siguientes: la secuencia señal para la interleucina-7 descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleucina-2 descrita en Cosman et al., 1984, Nature 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la Patente Europea N.º 0367 566; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 4,968,607; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo II descrito en la Patente Europea N.º 0 460 846.

Después de que se haya construido el vector, el vector completo se puede insertar en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o expresión de polipéptidos. La transformación de un vector de expresión para una proteína de unión al antígeno en una célula huésped seleccionada se puede realizar mediante métodos bien conocidos incluyendo transfección, infección, coprecipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano, u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte en función del tipo de célula huésped que se va a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen bien por el experto en la técnica y se exponen, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

Una célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza una proteína que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped la secreta en el medio) o directamente de la célula huésped que la produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias para la actividad (tal como glucosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, líneas celulares inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y una serie de líneas celulares diferentes. En ciertos casos, las líneas celulares pueden seleccionarse a través de la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen constitutivamente proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a CD30L. En otro caso, también se puede seleccionar una línea celular del linaje de linfocitos B que no fabrica su propio anticuerpo, sino que tiene la capacidad de producir y secretar un anticuerpo heterólogo. En otro caso, líneas celulares knock-out fucosiltransferasa que producen anticuerpos completos o parciales afucosilados (Patentes de Estados Unidos 6.946.292, US 7.425.446, US 7.846.725, US 8.067.232, células Potelligent® BioWa, Princeton, NJ).

Bioensayos de CD30L *in vitro*

También se describen métodos para identificar antagonistas que inhiben la interacción CD30/CD30L. Estos métodos hacen uso de la inducción de una citocina marcadora producida a partir de células CD30+ en respuesta a CD30L. El método comprende las etapas de combinar un compuesto de ensayo de interés con una fuente de CD30L; añadir el compuesto de ensayo/combinación de CD30L a células CD30+ que son capaces de expresar un marcador de citocina en respuesta a la interacción de CD30 y CD30L; cosechar el sobrenadante celular; y determinar si el compuesto de ensayo inhibe la interacción CD30/CD30L midiendo la cantidad de una citocina marcadora producida y/o liberada en el sobrenadante celular. Por ejemplo, tal bioensayo *in vitro* dependiente de CD30L puede explotar la línea celular de linfoma de células grandes anaplásico (ALCL) humano, la expresión de Karpas-299 (K299) de CD30 endógeno y la liberación de IL-8 de estas células en respuesta a la interacción de CD30 y CD30L. Estos métodos se

ilustran adicionalmente en los Ejemplos proporcionados en el presente documento.

Los compuestos de ensayo incluyen proteínas de unión al antígeno CD30L, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y sus derivados. Los compuestos de ensayo también podrían incluir compuestos CD30 solubles recombinantes (tales como dominio extracelular CD30 fusionado con una etiqueta Fc, etiqueta poli-HIS, etiqueta FLAG® y similares), así como moléculas pequeñas. Las líneas celulares CD30⁺ adecuadas expresan una citocina marcadora en respuesta a la interacción de CD30 y CD30L; dichas líneas celulares incluyen la línea celular de linfoma de células grandes anaplásico CD30⁺ humano K299 (Karpas-299, DSMZ, Alemania).

10

Las fuentes para CD30L incluyen construcciones de CD30L solubles y CD30L asociado a membrana. El CD30L soluble incluye composiciones quiméricas que comprenden un fragmento de CD30L, preferiblemente un fragmento de la región extracelular de CD30L. Dichas construcciones solubles incluyen construcciones de cremallera de leucina o isoleucina multiméricas. Dichas construcciones comprenden un motivo de cremallera de leucina de 33 aminoácidos unido al extremo N del dominio extracelular de CD30L humano o cynomolgus. Las construcciones de CD30L recombinantes solubles también están disponibles en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN). Otros CD30L solubles también incluyen el dominio extracelular CD30L fusionado a una etiqueta FLAG® (Axxora LLC, San Diego, CA). El CD30L asociado a la membrana incluye células y líneas celulares que expresan CD30L nativas y transfectadas. Dichas líneas celulares incluyen, pero sin limitación, células humanas tales como la línea de linfocitos B humanos CD30L⁺ Ramos (ATCC, Manassas, VA). También se contemplan los linfocitos T de sangre de mono cynomolgus y las líneas de células dendríticas de ratón.

Se describe en el presente documento un método para determinar la inducción por CD30L de la producción de IL-8 a partir de células CD30⁺ que comprende las etapas de: combinar un compuesto de ensayo con una fuente de CD30L; añadir la combinación de compuesto de ensayo-CD30L a células CD30⁺ irradiadas; cosechar el sobrenadante celular; y determinar la cantidad de IL-8 liberada en el sobrenadante celular. Este bioensayo *in vitro* dependiente de CD30L aprovecha la línea celular de linfoma de células grandes anaplásico (ALCL) humano, la expresión de Karpas-299 (K299) de CD30 endógeno y la liberación de IL-8 de estas células en respuesta a la interacción de CD30 y CD30L. La IL-8 liberada se puede cuantificar, por ejemplo, mediante un ELISA de IL-8. Los antagonistas CD30L, tales como las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento, se incuban con CD30L soluble (ensayo de células individuales) o con un CD30L asociado a membrana (ensayo de células dobles) y luego se cultivan con células K299. Los sobrenadantes celulares se recogen a continuación y la inhibición de la liberación de IL8 a partir de células K299 en respuesta al bloqueo por antagonistas CD30L, tales como las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento, se determina usando un ELISA tipo sándwich de IL-8.

Para el ensayo de células individuales, los antagonistas CD30L se titulan en placas de microtitulación de 96 pocillos, tales como placas de 96 pocillos Costar® (Corning, Acton, MA) para dar un intervalo deseado de concentraciones finales, por ejemplo, de 1 ug/ml a 10 pg/ml. Las proteínas de unión al antígeno CD30L, tales como las descritas en el presente documento, pueden usarse como controles positivos. Las placas se incubaron durante aproximadamente 45 minutos a temperatura ambiente. A cada pocillo se le añadió la fuente de células CD30⁺. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %.

Para el ensayo de células dobles, la fuente de CD30L está unida a la membrana e irradiada. Las células que expresan CD30L incluyen, pero sin limitación, células tales como la línea de linfocitos B humanos CD30L⁺ Ramos (ATCC, Manassas, VA), linfocitos T de sangre de mono cinomótico activados o líneas de células DC murinas de ratón. Las células que expresan CD30L pueden someterse a clasificación FACS antes del uso para seleccionar aquellas células con el nivel más alto de expresión de CD30L en la superficie celular. Las células que expresan CD30L se combinan con el antagonista CD30L y se incuban durante 45 minutos antes de añadirles a la fuente de células CD30⁺. De nuevo, las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Para ambos ensayos liberados, IL8 puede determinarse y cuantificarse mediante cualquier método para detectar IL-8, tal como, por ejemplo, un ELISA de tipo sandwich de IL-8. Dichos ensayos están disponibles en el mercado, tales como los proporcionados por R&D Systems (Minneapolis, MN). Los niveles de IL-8 se pueden interpolar a partir de la curva estándar de ELISA y los valores de CI₅₀ se determinan usando software comercialmente disponible, tales como DeltaSoft (DeltaSoft, Inc., Hillsborough, NJ) y GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Uso de proteínas de unión al antígeno CD30L humano para fines de diagnóstico y terapéuticos

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento son útiles para detectar CD30L en muestras biológicas e identificación de células o tejidos que producen CD30L. Las proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a CD30L se pueden usar en el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con CD30L en un paciente que lo necesite, por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno CD30L se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, inducción de IL-8 a partir de células CD30⁺. Las proteínas de unión a antígeno que se unen a CD30L pueden tener un uso terapéutico para mejorar las enfermedades relacionadas con CD30L.

Indicaciones

10 La presente invención también se refiere al uso de proteínas de unión al antígeno CD30L para su uso en la prevención o el tratamiento terapéutico de trastornos médicos, tales como los divulgados en el presente documento. Las proteínas de unión al antígeno CD30L son útiles para tratar una diversidad de afecciones en las que CD30L está asociado o desempeña un papel en contribuir a la enfermedad o trastorno subyacente o contribuye de otro modo a un síntoma negativo.

15

Se describen métodos para tratar una diversidad de enfermedades, tales como enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes y cáncer administrando a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende una o más de las proteínas de unión al antígeno CD30L descritas en el presente documento. Dichas composiciones son útiles para modular las respuestas inmunes *in vivo* bloqueando las interacciones entre las células CD30⁺ y CD30L⁺; agotando las células CD30L⁺; o por la actividad agonista en las células CD30L⁺.

20

CD30L puede presentar "señalización inversa", CD30L expresado en neutrófilos y los linfocitos T de sangre periférica pueden activarse mediante reticulación para estimular actividades metabólicas en esas células (Wiley et al., J Immunol 157: 3235-39, 1996; Cerutti et al., J. Immunol. 165: 786, 2000; Cerutti et al., Nat. Immunol. 2: 150, 2001). Como tal, las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento que se unen a CD30L podrían usarse para bloquear la señalización de CD30L inversa o estimular las células CD30L⁺.

25

Las células CD30⁺ están fuertemente asociadas con la enfermedad de Hodgkin y CD30 es un marcador clínico ampliamente utilizado para una serie de neoplasias hematológicas (para una revisión, véase Horie y Watanabe, Immuno. 10: 457-470, 1998). Las composiciones que comprenden una o más de las proteínas de unión al antígeno CD30L descritas en el presente documento, ya sea solas o junto con otras terapias, pueden ser útiles en el tratamiento de dichas afecciones.

30

CD30L se expresa en linfocitos T activados y ciertas poblaciones de linfocitos B y células dendríticas. CD30 se expresa en una proporción de linfocitos T y B activados. Este patrón de expresión sugiere que dirigir CD30L sería útil para modular la interacción entre los linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas. Se ha demostrado que CD30L afecta a la inmunidad humoral. Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento serían de utilidad en regímenes terapéuticos relacionados con enfermedades inflamatorias, particularmente las dirigidas por respuestas de linfocitos B dependientes de linfocitos T.

35

La artritis se puede tratar mediante los métodos y composiciones divulgados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "artritis" se refiere a afecciones inflamatorias crónicas que afectan principalmente a las articulaciones, o al tejido conectivo que rodea las articulaciones, aunque también pueden verse afectados diversos órganos del cuerpo. La artritis puede ser de origen autoinmune o traumático, o puede desencadenarse por la exposición a un antígeno extraño, lo que a su vez conduce a una afección crónica que ya no depende de la presencia continuada del antígeno desencadenante. El término "artritis", como se usa en el presente documento, incluye: artritis deformante; osteoartritis; artritis reumatoide (adulta y juvenil); artritis de la enfermedad de Lyme; artritis reactiva, incluida la enfermedad de Reiter; artritis psoriásica; artritis nodosa; espondiloartropatías seronegativas, incluyendo, pero sin limitación, espondilitis anquilosante.

40

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento son útiles en el tratamiento de una diversidad de trastornos reumáticos, que se definen en el presente documento como cualquier trastorno crónico que involucre inflamaciones dolorosas y a menudo múltiples localizadas de las articulaciones, músculos, nervios, tendones, piel, ojos, tejidos conjuntivos u otras sistemas de órganos. Estos incluyen, pero sin limitación, artritis; esclerodermia; gota; lupus eritematoso sistémico; polimialgia reumática; enfermedad de Still; uveítis crónica; trastornos que provocan la inflamación del músculo voluntario, incluyendo dermatomiositis y polimiositis, incluida la miositis esporádica por cuerpos de inclusión. El lupus eritematoso sistémico puede causar inflamación de las articulaciones, la piel, los riñones, el corazón, los pulmones, los vasos sanguíneos y el cerebro. En sus formas avanzadas, el lupus eritematoso sistémico puede provocar insuficiencia renal.

45

50

55

También se describen métodos para usar las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento en terapias para tratar diversos trastornos del sistema endocrino, incluyendo, pero sin limitación: diabetes de inicio juvenil o en la madurez (incluyendo tipos de diabetes autoinmunes, dependientes de insulina; tipos dependientes de insulina y diabetes mediada por obesidad); atrofia adrenal idiopática; enfermedad de Addison; hipotiroidismo; enfermedad de Graves; tiroiditis autoinmune, tal como tiroiditis de Hashimoto; y síndromes autoinmunes poliglandulares (tipos I y II).

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento también son útiles en terapias para tratar afecciones del sistema gastrointestinal, incluyendo, pero sin limitación: colangitis esclerosante autoinmune; enfermedad celíaca; enfermedades inflamatorias del intestino, incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa; pancreatitis autoinmune, incluyendo pancreatitis crónica; gastroparesia idiopática; y úlceras idiopáticas, incluyen úlceras gástricas y duodenales.

También se incluyen métodos para usar las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento en terapias para tratar trastornos del sistema genitourinario, tales como glomerulonefritis autoinmune e idiopática; y prostatitis idiopática crónica (no bacteriana), incluyendo la hipertrofia prostática benigna.

También se describen en el presente documento métodos para usar las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento en terapias para tratar diversos trastornos hematológicos, incluyendo, pero sin limitación: anemias y trastornos hematológicos, incluyendo anemia perniciosa y anemia aplásica, y anemia aplásica de Fanconi; anemia hemolítica autoinmune; púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); síndromes mielodisplásicos (incluyendo anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación); y síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS).

Las proteínas de unión a antígeno descritas son además útiles para tratar afecciones que afectan al hígado tales como hepatitis inflamatoria autoinmune o crónica.

Además, las proteínas de unión a antígeno divulgadas y la combinación se usaron para tratar diversos trastornos inflamatorios autoinmunes o crónicos que implican pérdida de audición. Una de estas es la pérdida auditiva asociada al nervio coclear o el oído interno que se cree que es el resultado de un proceso autoinmune, es decir, pérdida de audición autoinmune. Esta afección actualmente se trata con esteroides, metotrexato y/o ciclofosfamida, que pueden administrarse simultáneamente con un inhibidor o bloqueador de la interacción CD30/CD30L.

Varios trastornos inflamatorios pulmonares también se pueden tratar con las proteínas de unión a antígeno divulgadas, incluyendo: linfangioleiomiomatosis idiopática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) asociada con bronquitis crónica no infecciosa o con enfisema; y enfermedades pulmonares fibróticas, tales como fibrosis quística y fibrosis pulmonar idiopática.

Los trastornos asociados con el trasplante también son tratables con las proteínas de unión a antígeno divulgadas, incluyendo la enfermedad de injerto contra huésped. Para prevenir o mejorar la enfermedad de injerto contra huésped, las composiciones que comprenden una o más de las proteínas de unión a antígeno divulgadas se pueden administrar antes, junto con, o después de un trasplante de médula ósea o de un órgano sólido, incluido el trasplante de corazón, hígado, pulmón, piel, riñón u otros órganos.

Las proteínas de unión a antígeno divulgadas también son útiles para tratar enfermedades oculares inflamatorias crónicas, incluyendo uveítis autoinmunes.

Dichos compuestos también serían útiles para tratar enfermedades asociadas con la inflamación de las vías respiratorias, tales como el asma.

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento también son útiles para tratar trastornos inflamatorios que afectan al sistema reproductivo femenino, incluyendo: fallo/infertilidad de múltiples implantes; síndrome de pérdida fetal o pérdida embrionaria IV (aborto espontáneo); y endometriosis.

Otros trastornos médicos tratables con las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento incluyen inflamación crónica y/o enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. Esto incluye, por ejemplo, enfermedades asociadas con la desmielinización, tales como esclerosis múltiple, esclerosis sistémica y

síndromes de Guillain-Barre (incluida polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, neuropatía axonal motora aguda, neuropatía axónica sensorial aguda y síndrome de Fisher). La esclerosis múltiple es representativa de una enfermedad crónica y degenerativa del sistema nervioso central que puede tratarse con un agente capaz de inhibir o bloquear la interacción de CD30 y CD30L. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.652.854.

5

Otras afecciones inflamatorias crónicas tratables con las proteínas de unión a antígeno divulgadas incluyen enfermedad de aglutinina fría; síndrome de Behcet; síndrome de Sjogren; y tenosinovitis idiopática, así como diversos trastornos inflamatorios crónicos asociados con deficiencias hereditarias. Los inhibidores objeto, composiciones y terapias de combinación además son útiles para tratar la parálisis de Bell (parálisis facial idiopática); síndrome de fatiga crónica (no asociado con infección en curso); enfermedad crónica del disco vertebral degenerativo; síndrome de la guerra del Golfo; y miastenia gravis, que puede tratarse simultáneamente con corticosteroides.

Los trastornos que implican la piel o las membranas mucosas también son tratables usando las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento. Estos incluyen: enfermedades acantolíticas, que incluyen lupus discoide, lupus eritematoso cutáneo subagudo, vasculitis cutánea, enfermedad de Darier, queratosis folicular, pénfigo vulgar y pénfigo paraneoplásico; acné rosácea; alopecia areata; penfigoide bulloso; eccema; eritema, incluyendo eritema multiforme y eritema multiforme ampolloso (síndrome de Stevens-Johnson); enfermedad inflamatoria de la piel; liquen plano; enfermedad bulbar de IgA lineal (dermatosis bullosa crónica de la infancia); pérdida de elasticidad de la piel; dermatitis neutrófila (síndrome de Sweet); pitiriasis rubra pilaris; psoriasis; pioderma gangrenoso; pérdida de elasticidad de la piel; y necrólisis epidérmica tóxica.

Otras enfermedades que pueden tratarse con las proteínas de unión a antígeno divulgadas incluyen: Candidiasis mucocutánea crónica asociada a autoinmunidad; alergias; sarcoidosis; reticulohistiocitosis multicéntrica; granulomatosis de Wegener; arteritis, incluida arteritis de células gigantes; vasculitis y miocarditis autoinmune crónica.

Para tratar un trastorno médico usando las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico a un mamífero que lo necesita. El agente se administra de acuerdo con un régimen de dosis y frecuencia de administración que es adecuado para inducir una mejora sostenida en al menos un indicador que refleje la gravedad del trastorno. Una mejora se considera "sostenida" si el paciente presenta la mejoría en al menos dos ocasiones separadas por al menos un día, pero preferiblemente separadas en una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro o más semanas. La gravedad del trastorno se determina basándose en los signos o síntomas, o puede determinarse mediante cuestionarios que se administran al paciente, tal como los cuestionarios de calidad de vida utilizados a menudo por los médicos para evaluar el estado de las enfermedades crónicas.

Puede evaluarse uno o más indicadores que reflejan la gravedad de la enfermedad de un paciente para determinar si la frecuencia y la duración del tratamiento con fármaco son suficientes. El valor inicial para un indicador elegido se establece mediante el examen del paciente antes de la administración de la primera dosis del agente terapéutico. Preferiblemente, el examen inicial se realiza dentro de aproximadamente 60 días de la administración de la primera dosis.

Si la afección que se está tratando es lupus eritematoso sistémico, el indicador para determinar la suficiencia del tratamiento puede consistir en una mejora observada en uno de los siguientes: fatiga; fiebre; úlceras de la boca y la nariz; erupción facial ("sarpullido de mariposa"); fotosensibilidad (el SLE a menudo brota después de la exposición a la luz solar); pleuritis; pericarditis; fenómeno de Raynaud (reducción de la circulación a los dedos de manos y pies con exposición al frío); función del riñón; y recuento de glóbulos blancos (los pacientes con SLE a menudo tienen niveles disminuidos de glóbulos blancos).

50

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento formuladas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para su administración en sujetos humanos.

55 Métodos de diagnóstico

Las proteínas de unión a antígeno de las descritas se pueden utilizar con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades y/o afecciones asociadas con la interacción CD30/CD30L. Los ejemplos de métodos útiles en la detección de la presencia de CD30L incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo

inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA).

Para aplicaciones de diagnóstico, la proteína de unión al antígeno típicamente se marcará con un grupo marcador detectable. Los grupos marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (por ejemplo FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos de biotín, o epítomos polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomo). En algunos casos, el grupo marcador se acopla a la proteína de unión al antígeno a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen y pueden utilizarse diversos métodos para marcar proteínas.

Se describen otros métodos de diagnóstico para identificar una célula o células que expresan CD30L. En un caso específico, la proteína de unión a antígeno se marca con un grupo marcador y se detecta la unión de la proteína de unión a antígeno marcada para CD30L. En un caso específico adicional, la unión de la proteína de unión a antígeno con CD30L puede detectarse *in vivo*. En un caso específico adicional, la proteína de unión al antígeno CD30L se puede aislar y medirse utilizando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 y complementos periódicos); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* Nueva York: John Wiley & Sons.

Otros métodos proporcionan la detección de la presencia de una molécula de ensayo que compite por la unión a CD30L con las proteínas de unión al antígeno descritas. Un ejemplo de un ensayo de este tipo implicaría detectar la cantidad de proteína de unión al antígeno libre en una solución que contiene una cantidad de CD30L en presencia o ausencia de la molécula de ensayo. Un aumento en la cantidad de proteína de unión a antígeno libre (es decir, la proteína de unión al antígeno no unida a CD30L) indicaría que la molécula de ensayo es capaz de competir por la unión de CD30L con la proteína de unión a antígeno. En un caso, la proteína de unión al antígeno se marca con un grupo marcador. Como alternativa, la molécula de ensayo se marca y la cantidad de molécula de ensayo libre se controla en presencia y ausencia de una proteína de unión al antígeno.

30

Métodos de tratamiento: Formulaciones farmacéuticas, rutas de administración

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o varias de las proteínas de unión a antígeno y un excipiente, diluyente, vehículo, solubilizador, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Además, se incluyen métodos para tratar a un paciente mediante la administración de dicha composición farmacéutica. El término "paciente" incluye pacientes humanos. Los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen el alivio o prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno, o reducción de la gravedad de la enfermedad, y similares. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una proteína de unión al antígeno CD30L determinada para producir cualquier respuesta terapéutica en un mamífero. Dichas cantidades terapéuticamente eficaces se determinan fácilmente por un experto en la técnica. Para los fines de esta divulgación, los términos "dolencia", "enfermedad", "afección médica", "afección anormal", "padecimiento", "trastorno médico", "trastorno" y similares se usan indistintamente.

Una proteína de unión a antígeno no necesita realizar una curación completa, ni erradicar cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de una patología dada, pero no necesitan eliminar todas las manifestaciones de la enfermedad para considerarse como agentes terapéuticos útiles. De forma similar, no es necesario que un tratamiento administrado profilácticamente sea completamente eficaz para prevenir el inicio de una afección para constituir un agente profiláctico viable. Simplemente reduciendo el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o severidad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reduciendo la probabilidad de que la enfermedad se produzca o empeore en un sujeto, es suficiente. Ciertos métodos descritos en el presente documento comprenden administrar a un paciente un antagonista CD30L (tal como las proteínas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento) en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida sobre el valor inicial de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

Como se entiende en el campo pertinente, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención se administran a un paciente de una manera apropiada a la indicación. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier técnica apropiada, incluyendo, pero sin limitación, por vía parenteral, tópica o

- por inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, a través de la ruta intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, mediante inyección en bolo o infusión continua. Se contempla la administración localizada, por ejemplo, en un sitio de enfermedad o lesión, así como la administración transdérmica y la liberación sostenida de implantes. La administración por inhalación incluye,
- 5 por ejemplo, inhalación nasal u oral, uso de un nebulizador, inhalación del antagonista en forma de aerosol y similares. Otras alternativas incluyen gotas para los ojos; preparaciones orales que incluyen píldoras, jarabes, comprimidos para masticar o goma de mascar; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, aerosoles y ungüentos.
- 10 También se contempla el uso de proteínas de unión a antígeno en procedimientos *ex vivo*. Por ejemplo, la sangre de un paciente u otro fluido corporal puede ponerse en contacto con una proteína de unión a antígeno que se une a CD30L *ex vivo*. La proteína de unión a antígeno puede estar unida a una matriz insoluble apropiada o material de soporte sólido.
- 15 Ventajosamente, las proteínas de unión a antígeno se administran en forma de una composición que comprende uno o más componentes adicionales tal como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende adicionalmente uno o más agentes fisiológicamente activos para la terapia de combinación. Una composición farmacéutica puede comprender una proteína de unión al antígeno CD30L junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un tampón, un antioxidante tal como ácido
- 20 ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tal como aquellos que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un carbohidrato tal como glucosa, sacarosa o dextrinas, un agente quelante tal como EDTA, glutatión, un estabilizador y un excipiente. Una solución salina tamponada neutra o una solución salina mezclada con albúmina sérica coespecífica son ejemplos de diluyentes apropiados. De acuerdo con los estándares industriales apropiados, también pueden añadirse conservantes tales como alcohol bencílico. La composición puede
- 25 formularse como un liofilizado utilizando soluciones excipientes apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Los componentes apropiados no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Ejemplos adicionales de componentes que se pueden emplear en formulaciones farmacéuticas se presentan en cualquiera de Remington's Pharmaceutical Sciences incluyendo la 21ª Ed. (2005), Mack Publishing Company, Easton, PA.
- 30 Los kits para su uso por médicos incluyen una proteína de unión al antígeno CD30L y una etiqueta u otras instrucciones para su uso en el tratamiento de cualquiera de las afecciones analizadas en el presente documento. En un caso, el kit puede incluir una preparación estéril de una o más proteínas de unión al antígeno de unión a CD30L, que pueden estar en forma de una composición como se ha divulgado anteriormente, y pueden estar en uno
- 35 o más viales.
- Las dosis y la frecuencia de administración pueden variar de acuerdo con factores tales como la vía de administración, las proteínas de unión al antígeno particulares empleadas, la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar, si la afección es aguda o crónica, y el tamaño y el estado general del sujeto. Las dosificaciones
- 40 apropiadas se pueden determinar mediante procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo, en ensayos clínicos que pueden incluir estudios de escalado de dosis.
- Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En casos específicos, la dosificación puede variar de 0,1
- 45 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, opcionalmente de 1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, opcionalmente de 10 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 5 mg/kg, u opcionalmente de aproximadamente 0,3 mg/kg a 3 mg/kg.
- La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de unión al antígeno CD30L humano particular en la formulación usada. Típicamente, un médico administra la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) con el tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados. Una proteína de unión al
- 50 antígeno CD30L de la invención puede administrarse, por ejemplo, una vez o más de una vez, por ejemplo, a intervalos regulares durante un periodo de tiempo. En casos particulares, se administra una proteína de unión al antígeno CD30L durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos, o tres meses o incluso indefinidamente. Para tratar las enfermedades crónicas, el tratamiento a largo plazo es generalmente más eficaz. Sin embargo, para tratar afecciones agudas, la administración durante periodos más cortos, por ejemplo, de
- 55

una a seis semanas, puede ser suficiente. En general, la proteína de unión al antígeno se administra hasta que el paciente manifiesta un grado de mejora médicamente relevante sobre el valor inicial para el indicador o indicadores elegidos.

- 5 Se contempla que se administre una proteína de unión al antígeno CD30L al paciente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para inducir una mejora, preferiblemente una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleje la gravedad del trastorno que está siendo tratado. Se pueden evaluar diversos indicadores que reflejen la extensión de la dolencia, enfermedad o afección del paciente para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. Dichos indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores clínicamente reconocidos de
- 10 gravedad de la enfermedad, síntomas o manifestaciones del trastorno en cuestión. En un caso, se considera que una mejora es sostenida si el sujeto presenta la mejora en al menos dos ocasiones separadas en dos a cuatro semanas. El grado de mejoría generalmente se determina por un médico, que puede hacer esta determinación basándose en signos, síntomas, biopsias u otros resultados de prueba, y que también puede emplear cuestionarios que se administran al sujeto, tal como cuestionarios de calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.
- 15 Los casos particulares de métodos y composiciones de la invención implican el uso de una proteína de unión al antígeno CD30L y uno o más antagonistas CD30L adicionales, por ejemplo, dos o más proteínas de unión al antígeno de la invención, o una proteína de unión a antígeno de la invención y uno o más antagonistas CD30L. También se describen proteínas de unión al antígeno CD30L administradas solas o junto con otros agentes útiles para tratar la afección con la que el paciente está afectado. Los ejemplos de dichos agentes incluyen fármacos tanto
- 20 proteínicos como no proteínicos. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, antagonistas de TNF α , IL-1, IL-2, RANK u otras citocinas que pueden contribuir a la autoinmunidad o inflamación crónica. Los antagonistas de citocina incluyen aquellos que se dirigen a la citocina y/o a su receptor. Un antagonista que se dirige a una citocina puede comprender un receptor soluble contra la citocina y normalmente incluye parte o la totalidad del dominio extracelular de un receptor para la citocina. El receptor de citocina soluble puede usarse como un monómero, o como un dímero
- 25 o multímero superior (por ejemplo, como una molécula de fusión en la que el receptor soluble está unido a la porción Fc que promueve el dímero de la inmunoglobulina humana). En otros casos, el receptor de citocina soluble está pegado para aumentar su semivida en suero. En algunos casos, el antagonista de citocina soluble comprende un receptor soluble de TNF (tipo I o II). Las pequeñas moléculas orgánicas que inhiben las citocinas inflamatorias también pueden usarse junto con los agentes terapéuticos objeto. Se pueden administrar más de una proteína de
- 30 unión al antígeno del ligando CD30 y/o regiones de unión a antígeno de las mismas para tratar enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas, y se pueden administrar solas o junto con otros fármacos que son eficaces contra la misma afección inflamatoria autoinmune o crónica o que se están administrando para tratar una afección diferente en el mismo paciente.
- 35 Cuando se administran conjuntamente múltiples agentes terapéuticos, las dosificaciones se pueden ajustar en consecuencia, como se reconoce o se conoce en la técnica pertinente. Dichos agentes se pueden administrar de forma simultánea, consecutiva, alternativa o de acuerdo con cualquier otro régimen que permita que el curso total de la terapia sea eficaz.
- 40 Además de los pacientes humanos, las proteínas de unión al antígeno CD30L son útiles en el tratamiento de animales no humanos, tales como mascotas domésticas (perros, gatos, pájaros, primates, etc.), animales de granja domésticos (caballos, ganado, ovejas, cerdos, aves, etc.). En tales casos, se puede determinar una dosis apropiada de acuerdo con el peso corporal del animal. Por ejemplo, se puede usar una dosis de 0,2-1 mg/kg. Como alternativa, la dosis se determina de acuerdo con el área superficial del animal, una dosis ejemplar que varía de 0,1-20 mg/m², o
- 45 más preferiblemente, de 5-12 mg/m². Para animales pequeños, tales como perros o gatos, una dosis apropiada es de 0,4 mg/kg. La proteína de unión al antígeno CD30L (preferiblemente construida a partir de genes derivados de la especie receptora) se administra por inyección u otra ruta apropiada una o más veces por semana hasta que se mejore la condición del animal, o se puede administrar indefinidamente.
- 50 Los siguientes Ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan con fines ilustrativos solamente y no se deben interpretar como limitativos del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

DIVULGACIONES PARTICULARES

- 55 1. Una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L, que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 seleccionadas del grupo que consiste en:
- a) una CDRH1 que difiere en no más de cuatro sustituciones, inserciones o deleciones de

aminoácidos de una CDRH1 como se muestra en la TABLA 3;

b) una CDRH2 que difiere en no más de siete sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos de una CDRH2 como se muestra en la TABLA 3;

5

c) una CDRH3 que difiere en no más de eleven sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos de una CDRH3 como se muestra en la TABLA 3; y

que comprende al menos una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3 seleccionadas del grupo que consiste en:

10

d) una CDRL1 que difiere en no más de cuatro sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos de una CDRL1 como se muestra en la TABLA 3;

e) una CDRL2 que difiere en no más de dos sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos de una CDRL2 como se muestra en la TABLA 3;

15

f) una CDRL3 que difiere en no más de dos sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos de una CDRL3 como se muestra en la TABLA 3.

2. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 1 que comprende:

20

una CDRH1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:14, 15, 16, 17, 18, y 33;

una CDRH2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 34;

una CDRH3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 25, 26, 27, 28, 29, y 35;

una CDRL1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 30;

una CDRL2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, y 31; y

25

una CDRL3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 11, 12, 13, y 32.

3. Una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L humano que comprende al menos una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

30

a) una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en donde la CDR1 comprende los residuos aminoácidos 23-36, la CDR2 comprende los residuos aminoácidos 52-58 y la CDR3 comprende los residuos aminoácidos 91-100 de SEQ ID NOs:36, 28, 40, 42, o 44; o

35

b) una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la CDR1 comprende los residuos aminoácidos 25-36, la CDR2 comprende los residuos aminoácidos 52-58 y la CDR3 comprende los residuos aminoácidos 91-100 de SEQ ID NO:46; y

al menos una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la CDR1 comprende los residuos aminoácidos 31-35, la CDR2 comprende los residuos aminoácidos 50-65 y la CDR3 comprende los residuos aminoácidos 98-113 de SEQ ID NOs:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 o 72.

40

4. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 1 que comprende al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región variable de cadena ligera.

45

5. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 1 que comprende al menos dos regiones variables de cadena pesada y al menos dos regiones variables de cadena ligera.

6. Una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de región variable de cadena pesada difiere en no más de 31 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia de región variable de cadena pesada como se muestra en la TABLA 2; y en la que la secuencia de región variable de cadena ligera difiere en no más de 30 sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de una secuencia de región variable de cadena ligera como se muestra en la TABLA 1.

50

7. Una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L que comprende

55

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, y 72; y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 88 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 36, 38, 40, 42, 44, y 46.

8. Una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L seleccionada del grupo que consiste en

- 5 a) una proteína de unión a antígeno aislada que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 36;
- b) una proteína de unión a antígeno aislada que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:38;
- 10 c) una proteína de unión a antígeno aislada que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:66 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:40;
- d) una proteína de unión a antígeno aislada que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:68 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:42;
- e) una proteína de unión a antígeno aislada que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:70 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:44; y
- 15 f) una proteína de unión a antígeno aislada que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:72 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:46.

9. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 1-8, en la que dicha proteína de unión a antígeno es un anticuerpo.

20 10. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 9, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de anticuerpo de los mismos.

25 11. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 10, en la que dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diacuerpo, o una molécula de anticuerpo monocatenario.

12. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 10, en la que dicha proteína de unión a antígeno es un anticuerpo humano.

13. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 10, en la que dicha proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal.

30 14. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 9, en la que dicha proteína de unión a antígeno es del tipo IgG1, IgG2 IgG3 o IgG4.

15. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 14, en la que dicha proteína de unión a antígeno es del tipo IgG1 o IgG2.

35 16. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores, en la que dicha proteína de unión a antígeno tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:

- a) inhibir la interacción CD30/CD30L;
- b) inhibir la inducción de IL-8 inducida por CD30L;
- 40 c) la competición cruzada con uno de los anticuerpos A-F para la unión a CD30L humano;
- d) una constante de disociación ≤ 70 pM y
- e) la unión a CD30L humano con sustancialmente la misma K_D que uno de los anticuerpos A-F.

45 17. Una proteína de unión a antígeno aislada que se une a CD30L, en la que la proteína de unión a antígeno se une a una región C-terminal de CD30L definida por AA 201-234, o tal como AA 205-230 o AA 211-226.

18. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 17, en la que la proteína de unión a antígeno se une a una región adicional de CD30L definida por AA 75-95 tal como AA 80-90 o AA 82-88.

50 19. Una proteína de unión a antígeno aislada del párrafo 17 o 18, en la que dicha proteína de unión a antígeno tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:

- a) inhibir la interacción CD30/CD30L;
- b) inhibir la inducción de IL-8 inducida por CD30L;
- c) la competición cruzada con uno de los anticuerpos A-F para la unión a CD30L humano;
- d) una constante de disociación con respecto a CD30L humano es como máximo 70 pM y
- 55 e) la unión a CD30L humano con sustancialmente la misma K_d o inferior que uno de los anticuerpos A-F.

20. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-19, en la que la unión de la proteína de unión a antígeno con respecto a hCD30L se inhibe por la unión de un Fab de uno o

más de los anticuerpos A, B, C, D, E y F.

21. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-19, en la que la proteína de unión a antígeno compites con un Fab de uno o más de los anticuerpos A, B, C, D, E y F para la unión a CD30L.

5 22. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos 20-21, en la que el Fab es un Fab del anticuerpo A1.

23. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-22, en la que dicha proteína de unión a antígeno tiene una constante de disociación (K_D) con respecto al CD30L humano de como máximo 75 pM, tal como, como máximo 50 pM, tal como 40 pM.

10 24. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-23, que comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 y una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3,

15 en la que CDRL1 es la secuencia consenso CDRL1 de SEQ ID NO:30,
 en la que CDRL2 es la secuencia consenso CDRL2 de SEQ ID NO:31,
 en la que CDRL3 es la secuencia consenso CDRL3 de SEQ ID NO:32,
 en la que CDRH1 es la secuencia consenso CDRH1 de SEQ ID NO:33,
 en la que CDRH2 es la secuencia consenso CDRH2 de SEQ ID NO:34 y
 en la que CDRH3 es la secuencia consenso CDRH3 de SEQ ID NO:35.

20 25. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-23, que comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3 y una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3,

25 en la que CDRL1 es la secuencia consenso CDRL1 de SEQ ID NO:30,
 en la que CDRL2 es la secuencia consenso CDRL2 de SEQ ID NO:31,
 en la que CDRL3 es la secuencia consenso CDRL3 de SEQ ID NO:32,
 en la que CDRH1 es la secuencia de SEQ ID NO: 17 o la secuencia consenso CDRH1 de SEQ ID NO:75,
 en la que CDRH2 es la secuencia consenso CDRH2 de SEQ ID NO:34 y
 en la que CDRH3 es la secuencia consenso CDRH3 de SEQ ID NO:35.

30 26. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-23, que comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3

35 en la que CDRL1 es la secuencia consenso CDRL1 de SEQ ID NO:30,
 en la que CDRL2 es la secuencia consenso CDRL2 de SEQ ID NO:31,
 en la que CDRL3 es la secuencia consenso CDRL3 de SEQ ID NO:32,

40 y una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3,

45 en la que CDRH1 es la secuencia de SEQ ID NO: 17 o la secuencia consenso CDRH1 de SEQ ID NO:75,
 en la que CDRH2 se selecciona de la secuencia ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y
 en la que CDRH3 es la secuencia consenso CDRH3 de SEQ ID NO:35.

50 27. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-23, que comprende una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3

55 en la que CDRL1 es la secuencia consenso CDRL1 de SEQ ID NO:30,
 en la que CDRL2 es la secuencia consenso CDRL2 de SEQ ID NO:31,
 en la que CDRL3 es la secuencia consenso CDRL3 de SEQ ID NO:32,

y una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3,

en la que CDRH1 es la secuencia de SEQ ID NO: 17 o la secuencia consenso CDRH1 de SEQ ID NO:75,
 en la que CDRH2 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y
 en la que CDRH3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29.

28. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-23 que comprende:

- 5 una CDRH1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:14, 15, 16, 17 y 18;
una CDRH2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23 y 24;
una CDRH3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 25, 26, 27, 28 y 29;
una CDRL1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6;
10 una CDRL2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 7, 8, 9 y 10; y
una CDRL3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 11, 12 y 13.

29. Una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos anteriores 17-23 que comprende:

- 15 a) CDRH1, CDRH2 y CDRH3 identificadas por SEQ ID NOs: 14, 19, 25 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 identificadas por SEQ ID NO: 1, 7 y 11,
b) CDRH1, CDRH2 y CDRH3 identificadas por SEQ ID NOs:15, 21, 26 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 identificadas por SEQ ID NO: 2, 8 y 12,
20 c) CDRH1, CDRH2 y CDRH3 identificadas por SEQ ID NOs:15, 21, 26 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 identificadas por SEQ ID NO: 3, 8 y 12,
d) CDRH1, CDRH2 y CDRH3 identificadas por SEQ ID NOs:16, 22, 27 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 identificadas por SEQ ID NO: 4, 9 y 12,
e) CDRH1, CDRH2 y CDRH3 identificadas por SEQ ID NOs:17, 23, 28 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 identificadas por SEQ ID NO: 5, 8 y 13 o
25 f) CDRH1, CDRH2 y CDRH3 identificadas por SEQ ID NOs:18, 24, 29 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 identificadas por SEQ ID NO: 6, 10 y 12.

30. Una proteína de unión a antígeno que compite con al menos una proteína de unión antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 29.

31. Una proteína de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 29 que está completa o parcialmente afucosilada.

32. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos anteriores.

33. Una molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 32, en la que al menos una región variable de cadena pesada está codificada por una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73 y al menos una región variable de cadena ligera está codificada por una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 37, 39, 41, 43, 45, y 47.

34. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el párrafo 33, en la que dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control.

35. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el párrafo 32.

36. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el párrafo 32.

37. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con el párrafo 35.

38. Un polinucleótido aislado suficiente para su uso como una sonda de hibridación, cebador PCR o cebador de secuenciación que es un fragmento de la molécula de ácido nucleico del párrafo 33 o 34 o su complemento.

39. Un método para fabricar la proteína de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 31, que comprende la etapa de preparación de dicha proteína de unión a antígeno a partir de una célula huésped que secreta dicha proteína de unión a antígeno.

40. Una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 31 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

41. Una composición farmacéutica del párrafo 40, comprende además un grupo marcador o un grupo efector.

42. Una composición farmacéutica del párrafo 41, en la que dicho grupo marcador se selecciona del grupo que consiste en etiquetas isotópicas, etiquetas magnéticas, restos activos redox, tintes ópticos, grupos biotinilados y epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario.

43. Una composición farmacéutica del párrafo 42, en la que dicho grupo efector se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, radionúclido, una toxina, un grupo terapéutico y un grupo quimioterapéutico.

44. Un método para tratar o prevenir una afección asociada con CD30L en un paciente, que comprende

administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de al menos una proteína de unión a antígeno aislada de cualquiera de los párrafos 1 a 31.

45. Un método del párrafo 44, en el que la proteína de unión a antígeno aislada se administra en solitario o como una terapia de combinación.

5 46. Un método para reducir la actividad de CD30L en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos una proteína de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 31.

47. Una proteína de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 a 31 para su uso en un método de tratamiento.

10 48. Una proteína de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 a 31 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

49. Una proteína de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 a 31 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como artritis (incluyendo artritis reumatoide (RA), y lupus eritematosos sistémica (SLE), enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

15

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Generación de anticuerpos CD30L humanos

Se usó la tecnología XenoMouse™ (Amgen, Thousand Oaks, CA) para desarrollar anticuerpos monoclonales humanos que reconocen e inhiben la actividad de CD30L humano recombinante. Los anticuerpos seleccionados fueron reactivos de forma cruzada con CD30L humano y de cinomérico, pero no con CD30L de ratón.

25

Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron mediante tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT) para unirse a CD30L humano recombinante expresado en células 293T, y se cribaron por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FAC) para unirse a CD30L humano nativo en células de Ramos. En el ensayo FMAT, las placas se recubren con células 293T que expresan CD30L, se añade el sobrenadante de hibridoma y luego se añade un anticuerpo Ig antihumano secundario para la detección mediante técnicas de ELISA estándar. Los controles negativos fueron las correspondientes células 293T no transfectadas que no expresaban CD30L.

30

Los sobrenadantes se purificaron y los anticuerpos recombinantes se expresaron como construcciones de IgG1 e IgG2. Los anticuerpos se volvieron a cribar para unirse a CD30L humano nativo y de mono Cynomolgus. Brevemente, se incubaron células de Ramos de linfoma de Burkitt humano (3×10^5 /pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (placa Costar® de 96 pocillos (Corning; Acton, MA) con una titulación (10 µg/ml a 3,2 ng/ml de concentración final) de anticuerpos IgG anti-CD30L en tampón de bloqueo (PBS que contenía azida sódica al 0,02 %, suero de cabra normal al 2 % y suero de conejo normal al 1 %). Se incluyó proteína de fusión humana CD30.Fc como control positivo para la unión. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, luego se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 30 minutos más a 4 °C con 30 µl/pocillo de IgG-biotina anti-hu (1:50 en tampón de bloqueo; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Después del lavado 2 veces con PBS, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con 30 µl/pocillo (dilución 1:50 en PBS) de estreptavidina-ficoeritrina (PE, Molecular Probes, Eugene, OR). Las células se lavaron 2 veces con PBS y se prepararon para el análisis FAC. Los resultados se pueden encontrar en la Tabla 5.

45

Se prepararon linfocitos T activados por Cynomolgus aislando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre de mono cynomolgus heparinizado mediante centrifugación de densidad sobre IsolympH (2000 rpm durante 20 minutos). Las PBMC se suspendieron de nuevo en 25 ml de PBS, se añadieron a 300 µl de una solución al 50 % de eritrocitos de oveja tratados con bromuro de 2-aminoetiloloturonio (AET) y se centrifugaron a ~700 rpm a 40 °C durante 10 minutos. Las células sedimentadas se incubaron a 4 °C durante 20 minutos más, se suspendieron de nuevo suavemente y se centrifugaron sobre IsolympH. El sobrenadante se eliminó del sedimento de linfocitos T/eritrocitos. El sedimento se suspendió de nuevo entonces en 25 ml de tampón de lisis (cloruro de amonio al 0,85 % en agua) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Los linfocitos T resultantes se sedimentaron y se lavaron 2 veces en medio de cultivo (medio RPMI-1640 + suero fetal bovino inactivado por calor al 10 %) y luego se cultivaron (1 x 10⁶/ml) a 37 °C durante 18 horas en presencia de 10 ng/ml de miristato de acetato de forbol. (PMA; Sigma Chemicals, St Louis, MO) y 500 ng/ml de ionomicina (Calbiochem, San Francisco, CA). Al final del periodo de cultivo, se contaron los linfocitos T de cynomolgus y se lavaron 1 vez con PBS y se incubaron con suero de cabra al 2 %, suero de conejo al 1 % y suero humano al 0,1 % en PBS durante 30 minutos a 4 °C. Después, las células se tiñeron con anticuerpos anti-huCD30L como se ha descrito anteriormente para células de Ramos humanas. Los resultados

55

se pueden encontrar en la Tabla 5.

Los anticuerpos también se cribaron para determinar su capacidad para bloquear la unión de CD30L humano a una molécula de CD30.Fc humana soluble. Brevemente, se incubaron células de Ramos humanas o linfocitos T de mono
5 cynomolgus activados con IgG anti-CD30L a 50 µg/ml en tampón de bloqueo durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se añadió huCD30.Fc-His soluble a una concentración final de 2,5 µg/ml (30 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con 5 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-His de ratón (30 µl/pocillo en tampón de bloqueo) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Después del lavado dos veces con PBS, las células se incubaron con IgG-PE anti-ratón (1:50 en PBS; BD
10 Pharmingen, San Diego, CA) durante 30 minutos más a 4 °C. Después, las células se lavaron 2 veces con PBS y se prepararon para el análisis de FAC. Los resultados se pueden encontrar en la Tabla 5.

Ejemplo 2

15 Criba funcional del anticuerpo CD30L

Los anticuerpos se caracterizaron por su capacidad para bloquear las interacciones CD30L/CD30 usando dos ensayos de liberación de IL-8. Estos ensayos aprovechan la línea celular de linfoma anaplásico humano de células grandes (ALCL) Karpas-299 (K299), que expresa CD30 endógeno y libera IL-8 en respuesta a CD30L. Brevemente,
20 se incubaron anticuerpos IgG CD30L antihumano purificados con CD30L recombinante (ensayo de células individuales) o células de Ramos que expresan CD30L nativo (ensayo de células dobles) y se cultivaron con células K299. Después de un periodo de incubación definido, los sobrenadantes celulares se recogieron y se analizaron para determinar el contenido de IL-8 usando un ELISA de tipo sándwich para determinar la inhibición de la liberación de IL-8 de las células K299 en respuesta a CD30L por candidatos de anticuerpos.

25

Ensayo de células individuales

Los anticuerpos IgG anti-CD30L se titularon en diluyente de cultivo (medio RPMI-1640 + suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %) y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (placa de
30 96 pocillos Costar® (Corning; Acton, MA) para dar un intervalo de concentraciones finales de 1 µg/ml a 10 µg/ml. Como control positivo, se preparó un anticuerpo monoclonal CD30L antihumano de ratón como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.480.981. El volumen final de diluyente e IgG de CD30L fue de 100 µl/pocillo. A cada pocillo se le añadieron entonces 50 µl de cremallera de isoleucina CD30L humana recombinante (huCD30L LZ). La construcción huCD30L LZ consiste en el dominio extracelular de CD30L humano (véase la Patente de
35 Estados Unidos N.º 5.480.981) unido en su extremo N a un motivo de cremallera de isoleucina modificado mediante el reemplazo de residuos de leucina por residuos de isoleucina. El ensayo de células individuales también se usó para determinar la reactividad cruzada de cyno utilizando un cynoCD30L LZ en lugar del huCD30L LZ. Se preparó cynoCD30L LZ como se describe para la molécula LZ humana.

40 Las placas se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. A cada pocillo se le añadieron 50 µl de células K299 (4×10^5 células/ml). Las placas se incubaron entonces durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %.

La cantidad de IL-8 en los sobrenadantes celulares se determinó mediante ELISA tipo sándwich, usando un kit DuoSet ELISA CDCL8/IL-8 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los
45 niveles de IL-8 se interpolaron a partir de la curva estándar de ELISA usando el software DeltaSoft 3 versión 2.2 (DeltaSoft, Inc. Hillsborough, NJ). Todos los resultados se expresaron como la media ± error estándar de la media (SEM) para 3 cultivos replicados calculados mediante el software GraphPad PRISM v. 4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) como lo fueron los valores de CI⁵⁰. El valor de CI₅₀ derivado usando el huCD30L LZ para el Anticuerpo A1 fue de 2700 pM. Los resultados que usan el cynoCD30L LZ se pueden encontrar en la Tabla 5.

50

Ensayo de células dobles

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos IgG anti-CD30L se titularon en diluyente de cultivo y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo para proporcionar un intervalo de
55 concentraciones finales de 1 µg/ml a 10 pg/ml. El volumen final de diluyente e IgG de CD30L fue de 100 µl/pocillo. A cada pocillo se le añadieron 50 µl de células de Ramos CD30L⁺ irradiadas (5000 RADS) (4×10^6 /ml, ATCC). Las células de Ramos se sometieron a clasificación FACS para seleccionar las células con el nivel más alto de expresión de CD30L sobre la superficie celular.

Las placas se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. A cada pocillo se le añadieron 50 µl de células K299 (4 x 10⁵ células/ml). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %.

La cantidad de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante ELISA tipo sándwich, usando un kit DuoSet ELISA CDCL8/IL-8 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). La cantidad de valores de IL-8 y CI₅₀ se calculó como se ha descrito anteriormente, véase la Tabla 5.

Los anticuerpos principales se seleccionaron basándose en su capacidad para inhibir la inducción de IL-8 inducida por CD30L en comparación con el control de anticuerpo monoclonal CD30L antihumano de ratón.

10

Tabla 5 Tabla de CI₅₀ media (pM) y % de inhibición para los anticuerpos CD30L en diversos ensayos funcionales

Ensayos	Anticuerpos							A1	A1 IgG1
	A	E	F	C	D	B	A1		
huCD30L nativo (célula doble K299/Ramos, CI ₅₀)	28 pM	45 pM	60 pM	36 pM	62 pM	72 pM	33 pM	32 pM	
Unión nativa (FACS, CE ₅₀)									
Hu	1,7 nM	3,3 nM	2,3 nM	1,7 nM	3,3 nM	3,1 nM			
Cyno	2,2 nM	2,7 nM	2,9 nM	1,0 nM	2,7 nM	4,0 nM			
Bloqueo de CD30L LZ (Unión a K299, CI ₅₀)									
Hu	1,5 nM	2,1 nM	2,0 nM	1,9 nM			2,5 nM	1,4 nM	
Cyno	1,4 nM	1,3 nM	0,45 nM						
Bloqueo nativo (unión a CD30Fc, % de inhibición)									
Hu	68 %	80 %	ND	88 %	55 %	70 %			
Cyno	77 %	87 %	97 %	83 %	84 %	88 %			
Cyno CD30L LZ (K299/célula individual, CI ₅₀)	2,0 nM	5,4 nM	5,5 nM	3,9 nM	5,4 nM	5,6 nM	2,4 nM	1,5 nM	
Punto isoeléctrico teórico	8,89	8,86	8,96	8,74	9,01	8,84			

Ejemplo 3

15 Agrupamiento de anticuerpos CD30L por competición de unión

El agrupamiento se realizó usando un ensayo de competición de unión en el que un anticuerpo CD30L marcado compitió con cantidades en exceso de otros anticuerpos CD30L no marcados para la unión a rhCD30L. Los anticuerpos que compitieron entre sí se asignaron al mismo grupo. Los anticuerpos A-F compitieron entre sí por la unión a rhCD30L.

20

Ejemplo 4

25 Determinación de la constante de disociación de equilibrio (Kd) en la célula para anticuerpos CD30L

25

La afinidad de unión de los anticuerpos CD30L a CD30L expresada en células de Ramos se determinó por el método FACS Kd. Las células de Ramos se cultivaron en medio RPMI1640 + FBS al 10 % + L-glut + azida al 0,05 %. Se establecieron dos reacciones de equilibrio en las que los anticuerpos se titularon 1:3 de 60 nM a 338 fM usando un medio de cultivo celular y se incubaron con dos concentraciones celulares constantes diferentes (25000 y 250000 células). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 37 °C, 20 h, con agitación. Las placas de equilibrio se centrifugaron y los sedimentos celulares se lavaron dos veces con tampón FACS enfriado con hielo (1X D-PBS + FBS al 2 %). Las células se incubaron entonces con un anticuerpo secundario de cabra anti-humano Fc Cy5 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) y con 7AAD (BD-Biosciences, Rockville, MD) durante 1 h en hielo en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con tampón FACS enfriado con hielo antes del análisis por citometría de flujo. Los valores GeoMean de selección de cambio FL4 en la población de

35

células vivas miden el [Ab] unido. Después, se calculó la inversa de los valores de GeoMean que refleja el [Ag] teórico libre en la solución de equilibrio. Los valores inversos de la lectura de GeoMean se usaron en el software KinExA para el análisis y el cálculo de Kd para cada anticuerpo. La medida [Ag] libre se representó gráficamente frente a la concentración de partida del componente de titulación y a partir de estos gráficos en dos concentraciones de células diferentes, la Kd se obtuvo a partir del ajuste de curvas usando un análisis de curva n en el software KinExATM Pro. El intervalo de confianza del 95 % se da como Kd bajo y Kd alto.

Como se ve en la Tabla 6, los anticuerpos tienen alta afinidad por CD30L expresado en células de Ramos. Todos tenían valores de Kd en el intervalo de bajos pM.

10

Tabla 6 Tabla de intervalos de K_D (pM)

Anticuerpo	Kd (pM)	Kd baja (pM)	Kd alta (pM)
B	7,43	4,58	11,70
A	25,46	18,15	33,10
D	11,90	8,44	16,14
E	52,08	38,29	69,56
F	35,75	26,92	46,64
C	43,99	34,15	56,02

Ejemplo 5

15 Ensayo ADCC

Los dominios variables de A1 se unieron a un dominio constante de IgG1 humana (A1 IgG1). Este anticuerpo se expresó en una línea celular CHO knock-out Fut-8 dando como resultado un anticuerpo afucosilado, A1 IgG1f.

20 Se evaluó la muerte mediada por anticuerpo CD30L de células diana en un ensayo de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). La célula de Ramos diana (nivel de expresión de CD30L alto), JD38 (nivel de expresión de CD30L moderado), DS179 (nivel de expresión de CD30L bajo) y EW36 (sin expresión de CD30L) se recogieron y resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio cRPMI-10 (RPMI (Life Technologies, Carlsberg, CA) + suero bovino fetal al 10 %). Se añadió calceína-AM, 4 mM en DMSO anhidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) hasta una
25 concentración final de 10 μ M (dilución 1: 400). Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C seguido de dos lavados en PBS (1500 rpm, 5 minutos a 4 °C cada vez). Los sedimentos se resuspendieron en cRPMI-10 y se ajustaron a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml colocadas en hielo para su uso en la siguiente etapa.

El anticuerpo A1 IgG1 y anticuerpo A1 IgG1f se añadieron primero a placas de 96 pocillos con fondo en U (BD, Franklin Lakes, NJ) con una valoración en serie de 10 veces partiendo de 10 μ g/ml. Se usó Rituximab (Genentech, South San Francisco, CA) como control de anticuerpos positivos. El anticuerpo A1 (IgG2) se añadió como control negativo. A continuación, se añadieron células diana marcadas con calceína-AM, descritas anteriormente, a cada pocillo (10.000 células/pocillo) y se incubaron con anticuerpos durante 20 minutos a 37 °C. Después de la incubación, a cada pocillo se le añadieron 50 μ l de células NK a una concentración de 4×10^6 células/ml y se
35 incubaron durante 4 horas a 37 °C. Las células NK se sedimentaron (1500 rpm, 5 minutos a 4 °C) y se resuspendieron en cRPMI-10, ajustando la concentración de células a 4×10^6 células/ml.

Después de los controles de incubación se prepararon los pocillos añadiendo 20 μ l/pocillo de NP-40 al 9 % (IGEPAL CA 630, Sigma-Aldrich) para estimular el 100 % de lisis. Todos los demás pocillos recibieron 20 μ l/pocillo de medios de cRPMI-10 solo. Las placas se centrifugaron a 800 RPM durante 4 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante (150 μ l) y se transfirió a una placa de 96 pocillos negra de fondo claro (Corning, Lowell, MA) y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (Molecular Devices, Spectra max GEMINI), excitación 485, emisión 535.

El porcentaje de lisis máxima se calculó como (valor de muestra-lisis espontánea)/(lisis al 100 % - lisis espontánea) *
45 100.

Los resultados de la destrucción mediada por el anticuerpo CD30L de las cuatro células diana se muestran en la Figura 1 (A-D). El anticuerpo A1 IgG1 no medió la muerte celular en ninguna de las células que expresaban CD30L (véanse las Figuras 1A-D). El anticuerpo A1 IgG1f indujo la muerte celular en células diana con alta expresión de CD30L (véase la Figura 1A) y en células diana con expresión moderada de CD30L (véase la Figura 1B). El anticuerpo A1 IgG1f medió un mayor nivel de agotamiento en las células diana con una expresión de CD30L mayor que en las células diana con niveles moderados de CD30L (véanse las Figuras 1A y 1B). El anticuerpo A1 IgG1f no

destruyó las células diana con expresión baja (C) o nula (D) de CD30L.

Ejemplo 6

5 Mapeo de epítomos por HX-MS de mAb anti-CD30L

Las regiones de unión a CD30L de los anticuerpos anti-CD30L se evaluaron mediante HX-MS para identificar una o más regiones de CD30L humano implicadas en la interacción molecular con los anticuerpos A a F descritos en el presente documento.

10

Materiales

hCD30L: Se usaron dos versiones diferentes del dominio extracelular de hCD30L. His-hCD30L-EC contiene los residuos 63-234 de hCD30L identificados por la SEQ ID NO: 74 y como su nombre indica, la proteína se produce con una etiqueta His N-terminal (Sistemas RnD). FLAG-hCD30L-EC contiene los residuos 66-234 de SEQ ID NO: 74 y se obtuvo a partir de células de mamífero con una etiqueta FLAG-His N-terminal.

15

El ADNc del dominio extracelular de CD30L humano se adquirió de Origene. La etiqueta FLAG-His6 y un sitio de escisión de la proteasa TEV se fusionaron al extremo N de la secuencia codificante para los aminoácidos 66-234 mediante una PCR de extensión en dos etapas y se clonaron entre los sitios EcoRI y BamHI del plásmido pJSV001 en marco con un péptido señal CD33.

20

El FLAG-hCD30L-EC usado a continuación incluye una mutación puntual N153Q que anula una N-glicosilación. El mutante N153Q se generó con el kit de mutagénesis de punto de cambio rápido Qiagen (QIAGEN).

25

Se usaron células HEK293 6E para la producción de proteínas. Las células se cultivaron con medio Freestyle™ (Gibco) complementado con 25 ug/ml de Geneticin 418 (Gibco) y F-68 al 0,1 % (Gibco). El día de la transfección, las células se mantuvieron a una densidad de 1×10^6 células/ml y se transfectaron con 293 Fectin (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, se añadió peptona (Promega) al cultivo hasta una concentración final del 0,5 %. Las células continuaron creciendo durante 5 días antes de recoger el sobrenadante.

30

El sobrenadante del cultivo se recogió por centrifugación (15.000 rpm x 20 min, 4 °C) y luego se eliminó mediante filtración con membrana de nitrato de celulosa de 0,22 µm. El sobrenadante depurado se aplicó a una columna de Sepharose XK60 quelada con Ni (20 ml) (GE healthcare) seguido de un lavado de 10 volúmenes de columna con NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M. A continuación, la proteína se eluyó con un volumen de 5 columnas de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M. Las proteínas eluidas se agruparon, se concentraron a ~5 ml mediante unidades centrifugas Amicon ultra 15 (10.000 Da MWCO, Millipore) y se cargaron en una columna Hiloal 26/60 Superdex 200 318 ml (GE Healthcare) para eliminar los agregados y intercambiar en tampón en PBS. Después de la concentración, las concentraciones finales de proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm con un espectrómetro UV NANODROP. La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE.

35

40

Las desglucosilaciones se realizaron durante aproximadamente 16 h a 37 °C usando 1U PNGaseF (Roche) por 5 ug de hCD30L. La proteína desglucosilada se almacenó a 4 °C y se usó para experimentos en una semana. Todas las proteínas se intercambiaron en tampón en PBS a pH 7,4 antes de los experimentos de HX-MS.

45

Experimentos HX-MS

Instrumentación y registro de datos

50

Los experimentos HX se realizaron en un sistema nanoACQUITY UPLC con tecnología HDX (Waters Inc.) acoplado a un espectrómetro de masas Synapt G2 (Waters Inc.). El sistema Waters HDX contenía un robot Leap (H/Dx PAL; Waters Inc.) operado por el software LeapShell (Leap Technologies Inc/Waters Inc.), que realizó el inicio de la reacción de intercambio de deuterio, control del tiempo de reacción, reacción de interrupción, inyección en el sistema UPLC y control del tiempo de digestión. El robot Leap estaba equipado con dos pilas de temperatura controlada mantenidas a 20 °C para el almacenamiento de tampón y las reacciones de HX y se mantuvo a 2 °C para el almacenamiento de la proteína y la interrupción de la solución, respectivamente. El sistema Waters HDX además contenía una cámara de temperatura controlada que contenía las columnas pre y analíticas, y los tubos de LC y las válvulas de conmutación a 1 °C. Una cámara controlada por temperatura por separado mantiene la columna de

55

pepsina a 25 °C. Para la digestión de pepsina en línea, se cargaron 100 µl de muestra inactivada que contenía 300 pmol de hCD30L y se pasaron sobre un cartucho de pepsina inmovilizada Poroszyme® (2,1 x 30 mm (Applied Biosystems)) colocado a 25 °C usando un caudal isocrático de 100 µl/min (ácido fórmico al 0,1 %:CH₃CN, 95:5). Los péptidos resultantes se atraparon y se desalaron en una precolumna VanGuard BEH C18 de 1,7 µm (2,1 x 5 mm (Waters Inc.)). Posteriormente, las válvulas se conmutaron para colocar la precolumna en línea con la columna analítica, UPLC-BEH C18 1,7 µm (1 x 100 mm (Waters Inc.)), y los péptidos se separaron usando un gradiente de 9 min del 10-50 % de B administrado a 40 µl/min desde el sistema nanoAQUITY UPLC (Waters Inc.). Las fases móviles consistieron en A: ácido fórmico al 0,1 % y B: ácido fórmico al 0,1 % en CH₃CN. Los datos ESI MS y los experimentos de energía elevada (MS^E) separado se adquirieron en modo de ión positivo utilizando un espectrómetro de masas Synapt G2 (Waters Inc.). Se usó leucina-encefalina como la masa de bloqueo (ión [M+H]⁺ a m/z 556,2771) y los datos se recogieron en modo continuo (para una descripción más detallada, véase Andersen y Faber, *Int. J. Mass Spec.*, 302, 139-148(2011)).

Análisis de datos

Se identificaron péptidos pépticos en experimentos separados usando métodos estándar de MS^F donde los péptidos y los fragmentos se alinean adicionalmente utilizando las propiedades de movilidad iónica de Synapt G2 (Waters Inc.). Los datos de MS^E se procesaron usando ProteinLynx Global Server versión 2.5 (Waters Inc.). Los archivos de datos brutos de HX-MS se procesaron en el software DynamX 2.0 (Waters Inc.). DynamX realiza automáticamente la corrección de la masa de bloqueo y la determinación de incorporación de deuterio, es decir, la determinación del centroide de los péptidos deuterados. Además, todos los péptidos se inspeccionaron manualmente para asegurar la asignación correcta de picos y deuteraciones por parte del software.

Experimento de mapeo de epítotos

Se inició el intercambio de amida de hidrógeno/deuterio (HX) mediante una dilución de 6 veces de hCD30L en presencia o ausencia de mAb A, B, C, D, E o F en el tampón deuterado correspondiente (es decir, PBS preparado en D₂O, D₂O al 96 % final, pH 7,4 (valor no corregido)). Todas las reacciones de HX se realizaron a 20 °C y contenían hCD30L 6 µM (se usó un Pm monomérico) en ausencia o presencia de mAb 6,6 µM, dando de este modo un exceso molar de 2,2 veces de mAb. A intervalos de tiempo de 0,25, 0,5, 1, 3 y 10 minutos, se enfriaron alícuotas de 50 µl de la reacción de HX con 50 µl de tampón de inactivación enfriado con hielo (TCEP 1,35 M), dando como resultado un pH final de 2,5 (valor no corregido).

Resultados

Proteínas hCD30L

La presencia de glucosilaciones en hCD30L obstaculizaría un análisis HXMS. Debido a la masa desconocida y, a menudo, a la naturaleza heterogénea de las glucosilaciones de proteínas, los péptidos pépticos resultantes no se pueden identificar y analizar en MS. Sin embargo, la eliminación de las glucosilaciones de hCD30L podría crear una secuencia de aminoácidos bien definida adecuada para HXMS, ya que puede identificarse y analizarse en MS.

El dominio extracelular hCD30L contiene cinco sitios potenciales de N-glucosilación como se enumera en la primera columna de la Tabla 7 a continuación. Se intentó eliminar las glucosilaciones tanto por tratamiento con PNGaseF como por mutación puntual para obtener una proteína más adecuada para el análisis de HXMS.

Los análisis de MS y SEC-MALS de His-hCD30L-EC mostraron que cuatro de los cinco sitios potenciales de N-glucosilación estaban de hecho glucosilados (Tabla 7, datos no mostrados). Después de tratar esta proteína con PNGaseF en condiciones nativas, solo dos de las glucosilaciones pudieron eliminarse enzimáticamente mediante PNGaseF y, por lo tanto, quedaron dos N-glucosilaciones en la proteína.

Tras el tratamiento de FLAG-hCD30L-EC con PNGaseF en condiciones nativas, tanto MS como SEC-MALS demostraron que esta proteína podría estar completamente desglucosilada. En conclusión, la mutación N153Q suprime un sitio de N-glucosilación que no se pudo eliminar enzimáticamente de His-hCD30L-EC y esta proteína se consideró óptima para HXMS. En la Tabla 7 se incluye una descripción general de la evaluación de sitios de glucosilación.

Tabla 7: Estado de las glucosilaciones en las diferentes versiones de la proteína hCD30L

Sitio de N-glucosilación potencial de CD30L	His-hCD30L-EC	His-hCD30L-EC + PNGaseF	FLAG-hCD30L-EC (N153Q)	FLAG-hCD30L-EC + PNGaseF
N81	Glyc	D	Glyc	D
N109	Glyc	D	Glyc	D
N153	Glyc	Glyc	Q	Q
N189	N	N	N	N
N201	Glyc	Glyc	Glyc	D

D, N, Q representa la presencia del aminoácido no modificado en la posición de la secuencia.
Glyc representa la presencia de N-glucosilaciones

Análisis HX-MS

- Después de la reacción de intercambio de deuterio, hCD30L-EC se digiere con pepsina produciendo las regiones de péptidos pépticos descritas en la Tabla 8. La numeración de los residuos hCD30L sigue a SEQ ID NO 74, sin embargo la etiqueta FLAG-His N-terminal DYKDDDDKHHHHHHENLYFQG no es parte de la secuencia hCD30L. El transcurso de tiempo de HX de 40 péptidos pépticos, que cubre el 83 % de la estructura primaria de FLAG-hCD30L-EC, se controló en ausencia o presencia de mAb A, B, C, D, E o F y los datos se incluyen en la Tabla 8.
- 10 La secuencia restante no analizada en el presente estudio se cubrió con péptidos pépticos; sin embargo, la intensidad de señal fue insuficiente para el análisis de datos. El patrón de intercambio observado en los puntos temporales tempranos (<10 min) en presencia o ausencia de los mAb A1, B, C, D, E o F se puede dividir en dos grupos diferentes: Un grupo de péptidos pépticos hCD30L-EC presenta un patrón de intercambio que no se ve afectado por la unión de mAb. En contraste, otro grupo de péptidos en hCD30L muestra protección frente a
- 15 intercambio tras la unión de mAb (Tabla 8). En el caso de péptidos pépticos solapantes, la información de protección de intercambio se intenta sublocalizar con respecto a residuos específicos o tramos dentro del péptido asumiendo el intercambio completo de nuevo del extremo N del péptido y el primer enlace peptídico. La protección de intercambio en un péptido es indicativa de que esta región está implicada en la unión de mAb. Por lo tanto, el epítipo se encuentra parcial o totalmente dentro de la región definida por los péptidos específicos. Sin embargo, dado que la
- 20 resolución de HX-MS se basa en la digestión con pepsina de la proteína deuterada, la protección de intercambio dentro de una región dada no implica que cada residuo dentro de la región definida por los péptidos pépticos esté necesariamente implicado en la unión de mAb.

Mapeo de epítipos de mAb A1

- 25 Se mapeó el epítipo de mAb A1 en cuatro experimentos diferentes usando FLAG-hCD30L-EC tres veces y usando His-hCD30L-EC una vez. Ambas proteínas se trataron con PNGaseF antes de los experimentos de HX-MS. Los resultados de estos estudios fueron muy similares independientemente de la proteína hCD30L utilizada y todos produjeron la misma información de epítipo. Sin embargo, la cobertura de la secuencia fue obviamente menor en el
- 30 experimento de His-hCD30L-EC debido a la falta de péptidos detectables en las regiones glucosiladas.

- Se observó la señal del epítipo para mAb A1 en la región N-terminal de hCD30L (Tabla 8) hasta el residuo Cys88. La protección de intercambio se hizo más fuerte cuanto más tiempo se extendieron los péptidos desde los puntos de partida (residuos 45, 62 o 66), indicando así la protección de intercambio en la región más C-terminal de los péptidos
- 35 y también en el residuo 88. En contraste, los péptidos 45-65, 45-81 y 66-81 no mostraron protección de intercambio. Además, el residuo D81 es el sitio de glucosilación donde el N glucosilado se convierte en D tras la acción de PNGaseF. Por lo tanto, N/D81 probablemente no está implicado en la unión de mAb. Por lo tanto, la señal del epítipo parece surgir de residuos dentro de la región 82-88 CSEDLLC.
- 40 La señal del epítipo para mAb A1 también se observó en la región C-terminal de hCD30L (Tabla 8) en seis péptidos diferentes que cubrían la región F211 a S226. Basándose en el nivel de protección de intercambio observado, todas las partes de la región parecen estar implicadas en la unión o afectadas por la unión del mAb A en mayor o menor medida. Las regiones unidas por el anticuerpo están marcadas en negrita en la Tabla 8.
- 45 En conclusión, las regiones de hCD30L implicadas en la unión de mAb A se detectan como la región 82-88 CSEDLLC y la región 211-226 FQYIDTSTFPLENVLS.

Mapeo de epítipos de mAb B, C, D, E y F

- 50 Los epítipos de mAb B, C, D, E y F se mapearon usando FLAG-hCD30L-EC tratado con PNGaseF antes de los

experimentos de HX-MS. Los resultados del epítipo de estos estudios fueron muy similares al mAb A (tabla 8) también con respecto a la magnitud de la protección de intercambio. El mapeo del epítipo en mAb E se realizó dos veces, mientras que A, B, C y D se mapearon una vez cada uno.

5 **Tabla 8:** Análisis de HXMS de hCD30L humano que produce información del epítipo para moléculas de anticuerpo A-F

péptido hCD30L			Anticuerpo					
Inicio	Terminación	Secuencia	A1	B	C	D	E	F
45	65	DYKDDDDKHHHHHENLYFQG	N	N	N	N	N	N
45	81	DYKDDDDKHHHHHENLYFQGDSIPNSPDNVPLKGGD	N	na	na	na	N	na
45	84	DYKDDDDKHHHHHENLYFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSE	EX	EX	na	EX	EX	EX
45	86	DYKDDDDKHHHHHENLYFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSEDL	EX	EX	na	EX	EX	EX
45	87	DYKDDDDKHHHHHENLYFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSEDLL	EX	EX	na	EX	EX	EX
62	81	YFQGDSIPNSPDNVPLKGGD	N	W	W	N	N	W
62	84	YFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSE	W	W	W	W	W	W
62	85	YFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSED	na	W	na	na	na	W
62	86	YFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSEDL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
62	87	YFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSEDLL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
62	88	YFQGDSIPNSPDNVPLKGGDCSEDLLC	EX	EX	EX	EX	EX	EX
66	81	DSIPNSPDNVPLKGGD	N	na	na	N	N	na
66	86	DSIPNSPDNVPLKGGDCSEDL	W	W	W	W	W	W
66	87	DSIPNSPDNVPLKGGDCSEDLL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
87	102	LCILKRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
88	102	CILKRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
89	102	ILKRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
91	102	KRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
103	131	QVAKHLDKTKLSWNKDILHGVRVRYQDGNL	N	N	N	N	N	N
105	131	AKHLDKTKLSWNKDILHGVRVRYQDGNL	N	na	na	N	N	na
114	121	SWNKDGIL	N	na	na	N	N	na
114	129	SWNKDGILHGVRVRYQDG	na	N	N	na	na	N
114	131	SWNKDGILHGVRVRYQDGNL	N	N	N	N	N	N
132	138	VIQFPGL	N	N	N	N	N	N
132	139	VIQFPGLY	N	N	N	N	N	N
132	140	VIQFPGLYF	N	N	N	N	N	N
148	157	LVQCPQNSVD	N	N	N	N	N	N
158	162	LKLEL	N	N	N	N	N	N
163	173	LINKHIKKQAL	N	N	N	N	N	N
163	175	LINKHIKKQALVT	N	N	N	N	N	N
174	190	VTVCESGMQTKHVYQNL	N	N	N	N	N	N
174	192	VTVCESGMQTKHVYQNLNSQ	N	N	N	N	N	N
174	193	VTVCESGMQTKHVYQNLNSQF	N	N	N	N	N	N
176	190	VCESGMQTKHVYQNL	N	na	na	N	N	na
211	222	FQYIDTSTFPLE	EX	EX	EX	EX	EX	EX
211	225	FQYIDTSTFPLENVL	EX	na	na	na	EX	na
213	222	YIDTSTFPLE	EX	EX	EX	EX	EX	EX
213	225	YIDTSTFPLENVL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
213	226	YIDTSTFPLENVL	EX	EX	na	na	EX	EX
217	225	STFPLENVL	W	W	W	W	W	W

EX: protección de intercambio después de la unión del anticuerpo que indica la región del epítipo (>0,4 Da en al menos tres puntos de tiempo).
W: Protección de intercambio débil tras la unión del anticuerpo (0,2-0,4 Da en al menos tres puntos de tiempo).
N: N: Sin protección de intercambio tras la unión del anticuerpo (<0,2 Da).
na: No analizable en el experimento respectivo.

En conclusión, las regiones de hCD30L implicadas en la unión de mAb B, C, D, E y F son similares a las regiones implicadas en la unión de mAb A1 y se detectan como región 82-88 CSEDLLC y región 211-226 10 FQYIDTSTFPLENVL.

Ejemplo 7**Agrupamiento de anticuerpos CD30 L usando un A-F_{AB} anti-CD30L inmovilizado**

5

Los anticuerpos monoclonales CD30L antihumano se agruparon en epítomos en un Biacore T200 (GE Healthcare 28-9750-01) usando un enfoque de tipo sándwich clásico.

10 Para reducir el impedimento estérico, el anticuerpo inmovilizado se usó en un formato monovalente. Para determinar si la región de unión a antígeno de los anticuerpos anti-hCD30L se unía a epítomos solapantes, se probó la capacidad de los anticuerpos A-F para unirse a CD30L ya unido por el Fab del anticuerpo A1.

15 Los fragmentos Fab se pueden obtener digiriendo anticuerpos completos con papaína que se escinde aguas arriba de las cisteínas de la región bisagra o mediante expresión recombinante de las regiones variables de cadena pesada y ligera. El fragmento Fab de A1 anti-hCD30L (A1-F_{AB}) se preparó usando papaína inmovilizada en presencia de cisteína para escindir enzimáticamente toda la IgG justo encima de la región bisagra creando dos fragmentos Fab y un fragmento Fc por molécula de anticuerpo. El Fab se separó del Fc usando cromatografía de afinidad con Proteína A y luego se cambió el tampón por PBS. El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Pierce Fab Preparation Kit n.º 44985, Estados Unidos).

20

Se inmovilizó el F_{AB} CD30L antihumano (Fab del anticuerpo A1) y se capturó aquí el trímero CD30L-His₁₀ humano (R&D Systems 1028-CL). Posteriormente se inyectó A-F anti-hCD30L soluble. La unión del segundo anticuerpo implica que los dos anticuerpos están en diferentes grupos de epítomos.

25 Se diluyó A1-F_{AB} anti-hCD30L a 40 µg/ml en tampón acetato 10 mM, pH 5,0 y amina acoplada a un chip CM5 (GE healthcare BR-1000-12, BR-1000-50) a un nivel de 3566 RU, utilizando procedimientos estándar. El trímero CD30L-His₁₀ humano (R&D Systems 1028-CL) se diluyó a 10 nM en HBS-P+ (GE healthcare BR-1006-71) y se inyectó sobre la superficie de A-F_{AB} para capturar ~175 RU de CD30L. El segundo anticuerpo se inyectó a 75 nM sobre el hCD30L capturado. Los controles incluyeron una captura nula (solo tampón) e inyecciones de tampón en lugar de anticuerpos solubles. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.

30

El recubrimiento de hCD30L con A-FAB bloqueó la unión de un subgrupo de los cuerpos A-F. Los controles que usan A-Fab y A están ambos bloqueados como se esperaba. Además, también se evitó que los anticuerpos F y B se unieran al hCD30L capturado, mientras que los anticuerpos E, C y D fueron capaces de unirse a hCD30L demostrando que el epítomo de unión se puede distinguir del epítomo de unión de A, B y F. En conclusión, los anticuerpos A, F y B compiten con el Fab del anticuerpo A1 por la unión a hCD30L.

35

LISTA DE SECUENCIAS

40

<110> AMGEN Inc.
Novo Nordis A/S

<120> PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENO DE LIGANDO CD30

45

<130> 8679.204-WO

<160> 75

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400> 1

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Val Tyr Asp Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 2

ES 2 682 118 T3

<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 2
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

10 <210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 3
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr Asp Tyr Val Ser
1 5 10

20 <210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

25 <210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 5
Thr Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Thr Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

35 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

40 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 7
Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

50 <210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 9
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 Glu Val Ile Asn Arg Pro Ser
 1 5
 10

 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15

 <400> 10
 Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5
 20

 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 Ser Ser Tyr Thr Ser Arg Ser Thr Trp Val
 1 5 10
 25

 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30

 <400> 12
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
 1 5 10
 35

 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40

 <400> 13
 Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Trp Val
 1 5 10

 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45

 <400> 14
 Ser Tyr Ile Trp Ser
 1 5
 50

 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15
 Ser Tyr Tyr Trp Thr
 1 5

5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 16
 Ser Tyr Ser Trp Ser
 1 5

15

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 17
 Asn Asn Tyr Trp Ser
 1 5

25

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 18
 Ser Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

35

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 19
 Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

45

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 20
 Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 21
 Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 22

ES 2 682 118 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 22
 Arg Thr Ser Thr Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Arg Val Tyr Ser Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 15 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 24
 Arg Ile Phe Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 25 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15
 30 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 26
 Glu Arg Val Val Gly Ala Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val
 1 5 10 15
 40 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 27
 Asp Phe Thr Ile Ala Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 16
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

ES 2 682 118 T3

Glu Arg Ala Thr Val Thr Thr Arg Tyr His Tyr Asp Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Glu Arg Val Gly Val Gln Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 10 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> SECUENCIA CONSENSO
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> XAA PUEDE SER THR O SER
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> XAA PUEDE SER VAL O ILE
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> XAA PUEDE SER VAL, THR O LEU
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> XAA PUEDE SER ASP O ASN
 40 <400> 30
 Thr Gly Xaa Ser Ser Asp Xaa Gly Xaa Tyr Xaa Tyr Val Ser
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA CONSENSO
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> XAA PUEDE SER SER, ASN O ILE
 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)
 <223> XAA PUEDE SER ASN O LYS

 <400> 31
 5 Glu Val Xaa Xaa Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA CONSENSO

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> XAA PUEDE SER THR O SER

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> XAA PUEDE SER ARG O SER

 25 <400> 32
 Ser Ser Tyr Xaa Ser Xaa Ser Thr Trp Val
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA CONSENSO

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> XAA PUEDE SER SER O ASN

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> XAA PUEDE SER TYR O ASN

 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> XAA PUEDE SER ILE, TYR O SER

 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> XAA PUEDE SER THR O SER

 55 <400> 33
 Xaa Xaa Xaa Trp Xaa
 1 5

<210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA CONSENSO

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> XAA PUEDE SER ILE, VAL O THR

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> XAA PUEDE SER TYR, PHE O SER

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> XAA PUEDE SER THR, SER O ALA

 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> XAA PUEDE SER ILE, LEU, ASN, SER, ARG O GLN

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> XAA PUEDE SER THR O ASN

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> XAA PUEDE SER ASN O LYS

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> XAA PUEDE SER LYS O ARG

 45 <400> 34
 Arg Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Asn Tyr Xaa Pro Ser Leu Xaa Ser
 1 5 10 15

 <210> 35
 <211> 16
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA CONSENSO

 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)

<223> XAA PUEDE SER GLU O ASP

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (2)..(2)
 <223> XAA PUEDE SER ARG, THR O PHE

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (3)..(3)
 <223> XAA PUEDE SER VAL, ALA, ARG O THR

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (4)..(4)
 <223> XAA PUEDE SER VAL, THR, GLY O ILE

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (5)..(5)
 <223> XAA PUEDE SER VAL, ALA O GLY

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (6)..(6)
 <223> XAA PUEDE SER ALA, THR, GLY O GLN

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (7)..(7)
 <223> XAA PUEDE SER THR, ASP, ARG O SER

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (8)..(8)
 <223> XAA PUEDE SER ARG O TYR

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (10)..(10)
 <223> XAA PUEDE SER THR O HIS

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (12)..(12)
 <223> XAA PUEDE SER THR ASP O SER

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (14)..(14)
 <223> XAA PUEDE SER MET, LEU O VAL

 <400> 35
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Asp Val
 1 5 10 15
 55

 <210> 36
 <211> 110
 <212> PRT

ES 2 682 118 T3

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Val Tyr
20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Arg
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

5

<210> 37

<211> 326

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 37

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tctctgactg gaaccagcag tgacgttggg gtttatgact atgtctcctg gtatcaacag 120
caccaggca aagccccaa actcatgatt tatgaggta gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctaactgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacat ctctgggctc 240
caactgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcaggag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgt 326

15

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

20

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Tyr
20 25 30

ES 2 682 118 T3

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Phe Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 39
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 39
 cagtctgccc tgactcagcc tgctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggc cttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 caccagaca aagcccccaa actcatgatt tttgaggcca ataatcggcc ctcagggggt 180
 tctaatacgtc tctctggctc caactctggc aacacggcct cctgacat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttgggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta 330

10

<210> 40
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 40
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Arg Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Ile Ile Phe Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Tyr Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

ES 2 682 118 T3

cagtctgccc tgactcagcc tgctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcaactg gaaccagcag tgacattggt cttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 caccaggca aagccccaa actcataatt tatgaggta ttaatcggcc ctcaggggtt 180
 tctaactgct tctctggctc cgagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctggactc 240
 caggctgagg acgaggctaa ttattactgc agttcatata caagcagcag cacttgggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330

<210> 44
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 44
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Thr Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Thr Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asn Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

10

<210> 45
 <211> 326
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 45
 cagtctgccc tgactcagcc tgctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcaactg gaagcagcag tgacattggt acttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 taccaggca aagccccga actcatgatt tatgaggta ataatcggcc ctcaggggtt 180
 tctgatcgt tctctggctc cacgtctggc aatacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
 caggctaacg acgaggctga ttattactgc agtctatatt caagcagcag cacttgggtg 300
 ttcggcggag ggactaagct gaccgt 326

20

<210> 46
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 682 118 T3

<400> 46
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Thr Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Ser Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 47
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 47
 cagtctgccc tgactcagcc tgctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaactagcag tgacgttggt cttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 cagccaggca aagccccaa actcatgatt tatgaggcca gtaagcggcc ctcaggagtt 180
 tctaatacgt tctctggctc cacgtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
 caggctgacg acgaggctga ttattcctgc agctcatata caagcagcag cacttgggctc 300
 ttcggcggag ggaccaagct ga 322

15 <210> 48
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

ES 2 682 118 T3

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

<210> 49
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgaaagg gactggagtg gattgggcgt atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt cacccatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctatgaccgc cgcggacacg gccgtatatt actgtgagag agattatagg 300
 gtggctggca cttactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 50
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

ES 2 682 118 T3

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

<210> 51
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 51
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120
 gccggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctatgaccgc cgcggacacg gccgtatatt actgtgagag agattatagg 300
 gtggctggca cttactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

10

<210> 52
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 52
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

ES 2 682 118 T3

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ile Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 53
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 53
 caggTgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120
 gccggaaagg gactggagtg gattgggctg atctatgcca gtggaacac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtaaccgc cgcggacacg gccgtatatt actgtgagag agattatagg 300
 gtggctggca ctactacta ctactacggt ttggacgtct gggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

10

<210> 54
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 54
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

ES 2 682 118 T3

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

5
 <210> 55
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 cagctgcagg agtcgggccc aggactggtg aagccttcgg agaccctgtc cctcacctgc 60
 actgtctctg gtggctccat cagtagttac atctggagct ggatccggca gcccgccgga 120
 aagggactgg agtggattgg gcgtatctat gccagtgggc aaaccaacta caaccctcc 180
 ctcaagagtc gagtcacat gtcagtagac acgtccaaga accagttctc cctgaagctg 240
 agctctatga ccgccgcgga cacggccgta tattactgtg cgagagatta taggggtgct 300
 ggcacttact actactacta cggtttgac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

10
 <210> 56
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15
 <400> 56
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ile Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 682 118 T3

	35		40		45											
	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ala	Ser	Gly	Gln	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
	50						55					60				
	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65					70					75				80	
	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					85					90					95	
	Arg	Asp	Tyr	Arg	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asp
				100					105					110		
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
			115					120								
	<210>	57														
	<211>	366														
5	<212>	ADN														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	57														
	cagctgcagg	agtcgggccc	aggactggtg	aagccttcgg	agaccctgtc	cctcacctgc										60
	actgtctctg	gtggctccat	cagtagttac	atctggagct	ggatccggca	gcccgccgga										120
	aagggactgg	agtggtattg	gcgtatctat	gccagtgggc	aaaccaacta	caaccctcc										180
	ctcaagagtc	gagtcacat	atcagtagac	acgtccaaga	accagttctc	cctgaagctg										240
	agctctgtaa	ccgccgcgga	cacggccgta	tattactgtg	cgagagatta	tagggtggct										300
	ggcacttact	actactacta	cggtttggac	gtctggggcc	aagggaccac	ggtcaccgtc										360
	tcctca															366
10	<210>	58														
	<211>	124														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
15	<400>	58														
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
	1				5					10					15	
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Ile	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys

ES 2 682 118 T3

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 59
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgaaagg gactggagtg gattgggctg atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtaaccgc cgcggacacg gccgtatatt actgtgagag agattatagg 300
 gtggctggca cttactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

10

<210> 60
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 60
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
 Ile Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

ES 2 682 118 T3

	65			70				75			80					
	Lys	Leu	Ser	Ser	Met 85	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr 90	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys 95	Ala
	Arg	Asp	Tyr	Arg 100	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr 105	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly 110	Leu	Asp
	Val	Trp	Gly 115	Gln	Gly	Thr	Thr	Val 120	Thr	Val	Ser	Ser				

<210> 61
 <211> 379
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 61	cagatgtcag	gtgcagctgc	aggagtcggg	cccaggactg	gtgaagcctt	cggagacctt	60
	gtccctcacc	tgactgtct	ctggtggtc	catcagtagt	tacatctgga	gctggatccg	120
	gcagcccgc	gaaaggac	tggagtggat	tggcgtatc	tatgccagt	ggcaaacc	180
	ctacaacccc	tccctcaaga	gtcgagtcac	catatcagta	gacacgtcca	agaaccagtt	240
	ctccctgaag	ctgagctcta	tgaccgccgc	ggacacggcc	gtatattact	gtgcgagaga	300
	ttatagggtg	gctggcactt	actactacta	ctacggtttg	gacgtctggg	gccaaaggac	360
	cacggtcacc	gtctcctca					379

10

<210> 62
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 62	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
	1		5					10					15			
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25						30		
	Ile	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ala	Ser	Gly	Gln	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
		50					55					60				
	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65					70					75					80
	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala

ES 2 682 118 T3

				85					90				95				
	Arg	Asp	Tyr	Arg	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asp	
				100					105					110			
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120									
5	<210>	63															
	<211>	379															
	<212>	ADN															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	63															
	cagatgtcag	gtgcagctgc	aggagtcggg	cccaggactg	gtgaagcctt	cggagaccct											60
	gtccctcacc	tgactgtct	ctggtggctc	catcagtagt	tacatctgga	gctggatccg											120
	gcagcccgcc	ggaaaggac	tggagtggat	tgggcgtatc	tatgccagtg	ggcaaaccac											180
	ctacaacccc	tcctcaaga	gtcgagtcac	catgtcagta	gacacgtcca	agaaccagtt											240
	ctccctgaag	ctgagctctg	taaccgccgc	ggacacggcc	gtatattact	gtgcmgagaga											300
	ttataggggtg	gctggcactt	actactacta	ctacggtttg	gacgtctggg	gccaagggac											360
	cacggtcacc	gtctcctca															379
10	<210>	64															
	<211>	124															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
15	<400>	64															
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
	1				5					10					15		
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
	Tyr	Trp	Thr	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
	Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	
		50					55					60					
	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	
	65					70					75					80	
	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
					85					90					95		
	Arg	Glu	Arg	Val	Val	Gly	Ala	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Val	Asp	
				100						105						110	
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120									
20																	

ES 2 682 118 T3

<210> 65
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 65
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatacca gtggaatcac caactacaat 180
 ccctccctca agagtcgctg caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agagcgggta 300
 gtgggagcta gtaggtacta ctactacggt gtggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct cc 372

10

<210> 66
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Arg Val Val Gly Ala Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

15

115 120

20

<210> 67
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 67

ES 2 682 118 T3

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatacca gtggaatcac caactacaat 180
 ccctccctca agagtcgctg caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agagcgggta 300
 gtgggagcta gtaggtacta ctactacggt gtggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct cc 372

<210> 68
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 68
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Ser Thr Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Phe Thr Ile Ala Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 69
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 69

ES 2 682 118 T3

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagt agttactcct ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt accagtagca gtgggagaaa caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gttgacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agatttcact 300
 atagcagctc gtcgctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 70
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 70
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Val Tyr Ser Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Arg Ala Thr Val Thr Thr Arg Tyr His Tyr Asp Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 71
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 71

ES 2 682 118 T3

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcact aataactact ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg ggctggagtg gattgggcgt gtctatagta gtggactcac caactacaag 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca attctccctg 240
 aggttgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agagagggca 300
 acagtaacta cgaggtacca ctacgacggt atggacgtct ggggccaagg gacctcggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 72
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 72
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Glu Arg Val Gly Val Gln Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 73
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 73
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acttgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ES 2 682 118 T3

gccggaagg gactggagtg gattgggagc atctttgcca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca ggagtcgagt caccatgtca agagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtttatt actgtgcaa agaaagggg 300
 ggagtacagg attactacca ctattccggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

5 <210> 74
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(37)
 <223> Citoplasmático

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(62)
 <223> Transmembrana

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(234)
 <223> Extracelular

<400> 74
 Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
 20 25 30
 Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu
 35 40 45
 Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg
 50 55 60
 Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly
 65 70 75 80
 Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
 85 90 95
 Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
 100 105 110
 Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp

25

ES 2 682 118 T3

	115		120		125											
	Gly	Asn	Leu	Val	Ile	Gln	Phe	Pro	Gly	Leu	Tyr	Phe	Ile	Ile	Cys	Gln
		130					135					140				
	Leu	Gln	Phe	Leu	Val	Gln	Cys	Pro	Asn	Asn	Ser	Val	Asp	Leu	Lys	Leu
	145					150					155					160
	Glu	Leu	Leu	Ile	Asn	Lys	His	Ile	Lys	Lys	Gln	Ala	Leu	Val	Thr	Val
					165					170					175	
	Cys	Glu	Ser	Gly	Met	Gln	Thr	Lys	His	Val	Tyr	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln
				180					185					190		
	Phe	Leu	Leu	Asp	Tyr	Leu	Gln	Val	Asn	Thr	Thr	Ile	Ser	Val	Asn	Val
			195					200					205			
	Asp	Thr	Phe	Gln	Tyr	Ile	Asp	Thr	Ser	Thr	Phe	Pro	Leu	Glu	Asn	Val
	210						215					220				
	Leu	Ser	Ile	Phe	Leu	Tyr	Ser	Asn	Ser	Asp						
	225					230										
5	<210>	75														
	<211>	5														
	<212>	PRT														
	<213>	secuencia sintética														
10	<220>															
	<221>	misc_feature														
	<222>	(3)..(3)														
	<223>	en donde X es I, S o Y.														
15	<220>															
	<221>	misc_feature														
	<222>	(5)..(5)														
	<223>	en donde X es T o S.														
20	<400>	75														
	Ser	Tyr	Xaa	Trp	Xaa											
	1				5											

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a CD30L humano, que comprende una CDRH1, una CDRH2, una CDRH3, una CDRL1, una CDRL2, y una CDRL3, en el que
 - a) la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs: 14, 19, 25, respectivamente, y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por SEQ ID NOs: 1, 7 y 11, respectivamente, o
 - b) la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs:15, 21, 26, respectivamente, y la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por SEQ ID NOs: 2, 8 y 12, respectivamente, o
 - c) la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs:15, 21, 26, respectivamente, y la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por SEQ ID NOs: 3, 8 y 12, respectivamente, o
 - d) la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs:16, 22, 27, respectivamente, y la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por SEQ ID NOs: 4, 9 y 12, respectivamente, o
 - e) la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs:17, 23, 28, respectivamente, y la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por SEQ ID NOs: 5, 8 y 13, respectivamente, o
 - f) la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs:18, 24, 29, respectivamente, y la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por SEQ ID NOs: 6, 10 y 12, respectivamente.

2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a una región C-terminal de CD30L humano definida por AA 201-234.

3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo se une a una región adicional del CD30L humano definida por AA 75-95.

4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) inhibir la interacción hCD30/hCD30L;
 - b) inhibir la inducción de IL-8 inducida por hCD30L;
 - c) la competición cruzada con uno de los anticuerpos definidos en las secciones a) a f) de la reivindicación 1 para la unión a CD30L humano; y
 - d) tener una constante de disociación con respecto al CD30L humano de como máximo 70 pM.

5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo se une a CD30L humano con la misma Kd o inferior que uno de los siguientes anticuerpos:
 - A) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 36 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 50;
 - B) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 38 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 64;
 - C) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO 40: y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 66;
 - D) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 42 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 68;
 - E) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 44 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 70; o
 - F) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 46 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 72.

6. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo compite con un Fab de uno o más de los siguientes anticuerpos:
 - A) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 36 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 50;
 - B) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 38 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 64;
 - C) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO 40 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO 66;
 - D) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 42 y una región

variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 68;

E) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 44 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 70; y

5 F) que comprende una región variable de cadena ligera como se define por SEQ ID NO: 46 y una región variable de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 72

para la unión a CD30L humano.

7. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo
10 es del tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

8. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se identifican por SEQ ID NOs: 14, 19, 25, respectivamente, y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se identifican por
15 SEQ ID NO: 1, 7 y 11, respectivamente.

9. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 48 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 36.

10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de una cualquiera de las
20 reivindicaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25 12. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.

Fig. 1A

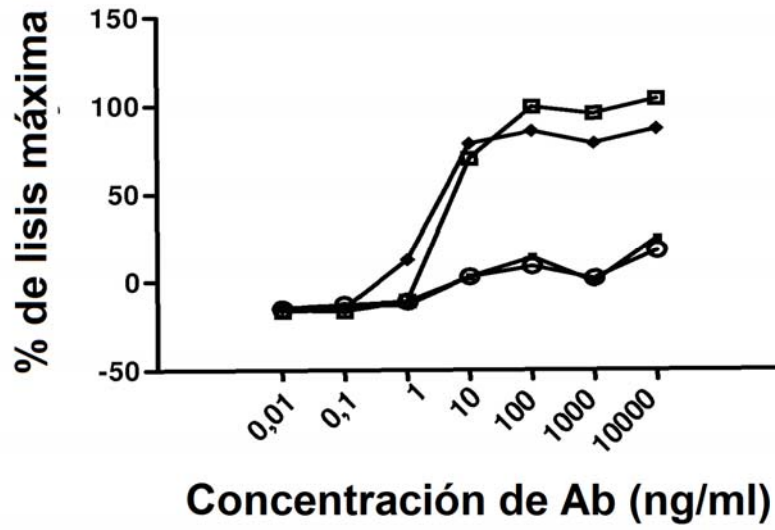


Fig. 1B

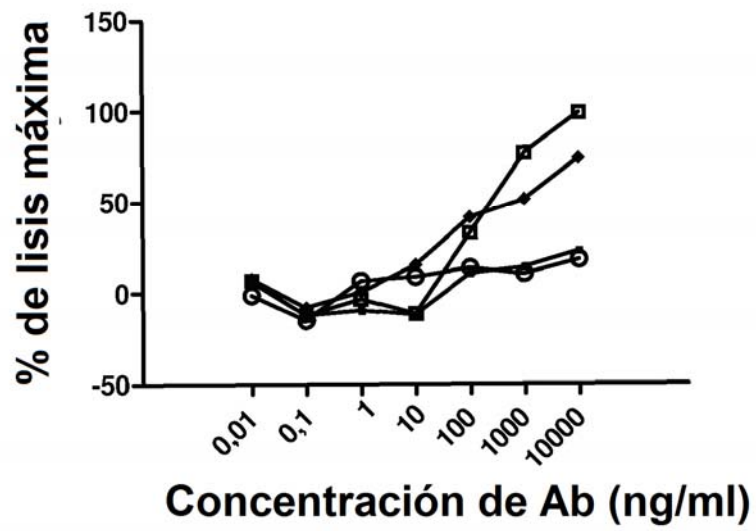


Fig. 1C

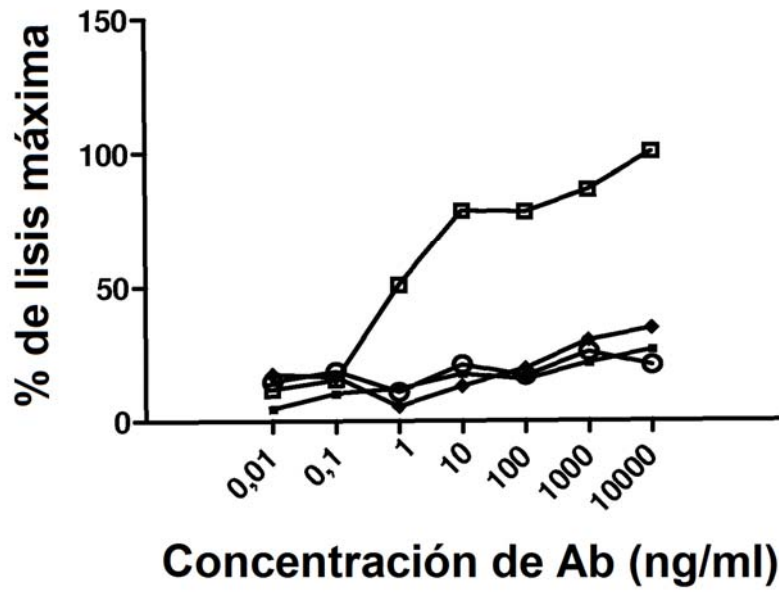


Fig. 1D

