



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 448**

51 Int. Cl.:

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02704692 .9**

86 Fecha de presentación : **07.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1358318**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

54 Título: **Línea de células de hibridoma G250 y su uso para producir anticuerpos monoclonales.**

30 Prioridad: **07.02.2001 US 266853 P**
05.10.2001 US 327008 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Wilex AG.**
Grillparzerstrasse 10B
81675 München, DE

72 Inventor/es: **Oosterwijk, Egbert;**
Warnaar, Sven y
Ullrich, Stefan

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Línea de células de hibridoma G250 y su uso para producir anticuerpos monoclonales.

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

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

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

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

El anticuerpo monoclonal G250 así como derivados quiméricos del mismo se han utilizado en estudios clínicos (Steffens *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997), 1529-1537). La secuencia de ácido nucleico codificante del sitio de fijación de antígeno de G250 es el asunto de la solicitud US también en tramitación No. 60/266 853, que se incorpora en esta memoria por referencia.

La producción de una línea de células de hibridoma que expresa el anticuerpo G250 se describió en líneas generales en la solicitud de Patente Internacional W088/08854 y en Oosterwijk *et al.*, (*supra*). Como se ha indicado anteriormente, se utilizó como inmunógeno un homogeneizado de células procedentes de lesiones RCC primarias obtenido de diferentes pacientes y por consiguiente un material inespecífico. Adicionalmente, la línea de células de hibridoma no había sido depositada en una institución depositaria reconocida de acuerdo con el Tratado de Budapest. Así pues, no parece posible una reproducción exacta de la línea de células de hibridoma G250 a partir de los documentos de la técnica anterior disponibles públicamente.

Entretanto, se ha encontrado que el anticuerpo G250 se fija al denominado antígeno MN que se describe, v.g., en el documento W093/18152. Sin embargo, el sitio de fijación de G250 en el antígeno MN no se conoce actualmente. Además, resultados recientes demuestran que el sitio de fijación de G250 es un epítipo estructural, lo cual aumenta adicionalmente la dificultad para reproducir la línea de células de hibridoma G250, dado que no puede proporcionarse ninguna secuencia epitópica especificada en el antígeno MN que se fije a G250.

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

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

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

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

De acuerdo con la invención, el término “anticuerpo G250” abarca cualquier anticuerpo con inclusión de anticuerpos multiespecíficos (v.g. anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo con tal que los mismos exhiban la actividad deseada, es decir, al menos un sitio de fijación de antígeno de G250. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM, IgG (v.g. IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄), IgD, IgA o IgE, particularmente un anticuerpo IgG, un anticuerpo recombinante o un fragmento de anticuerpo obtenido por métodos proteolíticos o por métodos de DNA recombinante.

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

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

Preferiblemente, el término “anticuerpo” empleado en esta memoria incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y totalmente humanizados, anticuerpos de una sola cadena, v.g. fragmentos de anticuerpo sFv, fragmentos de diacuerpo, fragmentos de anticuerpo proteolíticos o recombinantes tales como Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos fijadores de antígeno. El anticuerpo puede ser también una fusión o un conjugado con otras entidades.

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

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

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

Adicionalmente, los anticuerpos incluyen de modo específico diacuerpos, es decir pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de fijación de antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada conectado a un dominio variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica. Por la utilización de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de fijación de antígeno. La fabricación de diacuerpos ha sido descrita v.g. por Hollinger *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444-6448), que se incorpora en esta memoria por referencia.

Adicionalmente, los anticuerpos incluyen específicamente anticuerpos multiespecíficos, v.g. anticuerpos hetero-

biespecíficos que comprenden al menos un sitio de fijación de antígeno de G250 y el sitio de fijación de antígeno de un anticuerpo diferente, v.g. un anticuerpo anti-CD3.

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

Adicionalmente, el anticuerpo G250 puede estar conjugado, v.g. por acoplamiento covalente o fusionado a un grupo marcador adecuado, v.g. un grupo fluorescente, un grupo marcador radiactivo, etc. o un agente citotóxico con inclusión de isótopos radiactivos tales como I, Y, Pr, Tm, In, tal como ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tm}$ o ^{111}In , agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

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

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

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

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

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

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de la célula de hibridoma depositada y células de progenie de la misma para fabricar anticuerpos G250 como se ha descrito arriba, v.g. anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanizados, anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos (Fab')₂, Fab', Fab y Fv.

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

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

Ejemplo 1

Depósito de la línea de células de hibridoma G250

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

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

Ejemplo 2

Mapeado del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal G250

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

ES 2 266 448 T3

- MAbG23U no reacciona con el antígeno 6250 en el análisis de transferencia Western.
- La purificación del antígeno G250 por cromatografía de afinidad de MAbG250 es altamente ineficiente, disminuyendo las eficiencias con el aumento del tiempo necesario para realizar la purificación, lo que sugiere una degradación/despliegue rápidos del epítipo G250, a pesar de las condiciones óptimas para impedir la proteólisis.
- La adición de detergentes en general conduce a una disminución de los niveles de detección de G250 en ELISA.
- La truncación del cDNA codificante del antígeno G250, seguida por transfección transitoria en células negativas para G250, seguida por análisis inmunohistoquímico reveló:

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 3

*Desarrollo de una línea de células quimérica productora de IgG de G250**Estrategia general*

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

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

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

Clonación de cDNA de VH y VL de G250

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

Clonación de los Genes de la Región Variable de G250

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

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

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

Los clones positivos para los genes de las cadenas pesada y ligera se aislaron después de al menos 3 tandas de purificación de calvas utilizando las sondas de la región J para comprobar la hibridación al DNA de fago en cada etapa de purificación. El DNA purificado a partir de los codones de fago aislados para los genes pesados y ligeros se digirió con EcoRI (cadena pesada) o HindIII (cadena ligera) y se fraccionó en geles de agarosa. Los fragmentos

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

Plásmidos de Expresión

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

Expresión del Anticuerpo Quimérico G250

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

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

Ejemplo 4

Uso del anticuerpo quimérico G250 en un estudio clínico

Protocolo de administración

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

Conclusiones de eficacia

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

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

Un paciente alcanzó una remisión objetiva completa. La respuesta objetiva ocurrió tarde, más de seis meses después del comienzo de la terapia de estudio. Otro paciente experimentó una reducción relevante del 59% en el tamaño de sus lesiones diana. La respuesta de ambos pacientes continúa en las semanas 64 y 70, respectivamente, con arreglo a la evaluación efectuada en diciembre de 2001. La regresión del tumor ocurrió tarde, más de seis meses después del comienzo de la terapia de estudio. Una aplicación de la respuesta tardía puede ser que la duración del tratamiento con inyecciones intravenosas del anticuerpo quimérico fue relativamente corta y desarrolló una respuesta inmunitaria retardada no relacionada con ADCC.

ES 2 266 448 T3

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

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

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

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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una célula de hibridoma DSM ACC 2526 que produce el anticuerpo monoclonal G250.

2. El uso de la célula de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de una célula de progenie que produce el anticuerpo monoclonal G250.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual dicha célula de progenie se ha obtenido por transferencia de material genético que codifica el anticuerpo G250 o al menos el sitio de fijación de antígeno del mismo a una célula receptora.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el cual dicha célula de progenie produce un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monocatenario, o fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab', o Fab.

5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el cual dicha célula de progenie es una célula procariota.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual dicha célula de progenie es una célula de *E. coli*.

7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el cual dicha célula de progenie es una célula eucariota.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual dicha célula de progenie es una célula de levadura, una célula de mieloma o una célula CHO.

9. Un método de producir un anticuerpo G250 que comprende:

cultivar una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en condiciones adecuadas, en las cuales se produce el anticuerpo, y obtener el anticuerpo a partir de la célula y/o del medio de cultivo.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, utilizado para producir una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo G250 como agente activo.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la formulación farmacéutica comprende el anticuerpo quimérico G250.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la formulación farmacéutica comprende el anticuerpo quimérico G250 en forma radiomarcada.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la formulación farmacéutica comprende un anticuerpo quimérico G250 acoplado a una citoquina tal como IL-2, TNF y/o GM-CSF.

14. Uso de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la fabricación de un anticuerpo G250.

VH G250

[illegible]

VL G250

121/41 121/51 181/61 211/71

gag cag tct cct aag cta att taa gca tcc aat cgg tac aat gga gtc gtc gat cgc ttc aga gat ttc aga gct ctc acg att agc aat atg cag tct

o q s p k l l i y s a s h r y t g v p d r p t q s o s q t g g y aca gat ttc acg att agc aat atg cag tct

L2

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