BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda
DIL
D6F

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 07-96516

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE CARECEN DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA CD30

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** MEDAREX, INC.

DOMICILIO NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-096516- -00000-0000
Fecha: 2007-09-18 16:51:31 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 323

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

18/09/2007

SOLICITUD DE:

1. ☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
   ☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2. SOLICITANTE (71)

Nombre: **MEDAREX, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 707 State Road,
Princeton,
New Jersey 08540,
Estados Unidos de América

Domicilio: Princeton,
New Jersey,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3. REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4. INVENTOR (ES) (72)

1. **Josephine M. CARDARELLI**
126 Leslie Drive,
San Carlos,
California 94070,
Estados Unidos de América

2. **Amelia Nancy BLACK**
124 Capistrano Place,
Los Gatos,
California 95035,
Estados Unidos de América

5. PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/005854 Fecha: 17 de febrero de 2006
Publicación Internacional No. WO 2006/089232 A2 Fecha: 24 de agosto de 2006

6. Título (54)

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE CARECEN DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA CD30

7. Clasificación Internacional (51) C07K 016/030

8. Prioridad SI☒ NO☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	18 de febrero de 2005	60/654,197

9. Comprobante de pago No.: 07-72,886 **Fecha:** 10 de septiembre de 2007

10

Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 482.000.oo.
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

FBH

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/089232 A2
   Descripción:
   Páginas 75 en el idioma original
   Páginas 146 en español
   Reivindicaciones: Número (s) 31
   Figuras: Número (s)

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias

4. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

2X

4

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country:* United States of America

This public document

2. *has been signed by:* Jacquelyn Saya Horne

3. *acting in the capacity of:* Notary Public

4. *bears the seal/stamp of:* the State of Massachusetts
whose commission expires on: December 7, 2012

Certified

5. *at:* Boston, Massachusetts

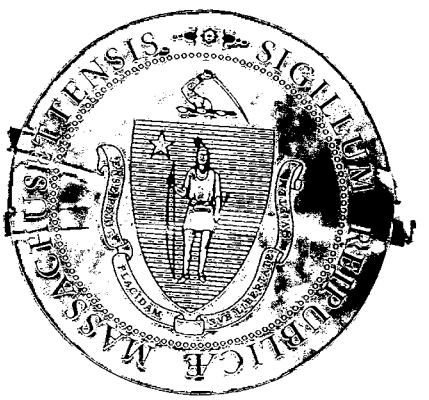
6. *the:* 24 July, 2007

7. *by:* the Secretary of the Commonwealth

8. *No.:* 1244570

9. *Seal/stamp:*

Great Seal of the Commonwealth



10. *Signature:*

William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

prepared by EBurgos

5

(MXI-333CO)

IN THE PATENT OFFICE OF COLUMBIA

Assignee(s): **Medarex, Inc.**

Inventor(s): **Josephine M. CARDARELLI, *et al.***

Serial No.: **US 60/654,197**

Filed: **February 18, 2005**

Title: **MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES**

CERTIFICATION

I, Jane E. Remillard, attorney for the applicant, hereby attest that the attached document is a true and exact copy of the Assignment executed by inventors **Josephine M. CARDARELLI** and **Amelia Nancy BLACK** recorded with the United States Patent and Trademark Office on October 28, 2005, under Reel/Frame No. 016955/0890. The Assignment is from said inventor(s) to **Medarex, Inc.**, a corporation of New Jersey having its principal place of business in New Jersey.

Jane E. Remillard
Registration No. 38,872
Attorney for Applicant

United States of America)
Commonwealth of Massachusetts) ss.:
County of Suffolk)

On this 23 day of July, 2007 before me, the undersigned notary public, personally appeared Jane E. Remillard (name of document signer), proved to me through satisfactory evidence of identification, which was that she is known to me personally, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document in my presence.

(official signature and seal of notary)

JACQUELYN SAYA HORNE
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
December 7, 2012

Jacquelyn Saya Horne
My commission expires December 7, 2012

6

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

DECEMBER 30, 2005

PTAS

700221304A

700221304A

GIULIO A. DECONTI, JR.
LAHIVE & COCKFIELD, LLP
28 STATE STREET
BOSTON, MA 02109

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/28/2005

REEL/FRAME: 016955/0890
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: MXI-333-1

ASSIGNOR:
CARDARELLI, JOSEPHINE M.

DOC DATE: 09/30/2005

ASSIGNOR:
BLACK, AMELIA NANCY

DOC DATE: 09/13/2005

ASSIGNEE:
MEDAREX, INC.
707 STATE ROAD
PRINCETON, NEW JERSEY 08540

SERIAL NUMBER: 60654197
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 02/18/2005
ISSUE DATE:

TITLE: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

LENELL MACKALL, SUPERVISOR
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

Form PTO-1595 (Rev. 07/05)
OMB No. 0651-0027 (exp. 6/30/2008)

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

To the Director of the U.S. Patent and Trademark Office: Please record the attached documents or the new address(es) below.

1. Name of conveying party(ies):

Josephine M. CARDARELLI (09/30/2005) and
Amelia Nancy BLACK (09/13/2005)

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? [ ] Yes [X] No

2. Name and address of receiving party(ies)

Name: MEDAREX, INC.

Internal Address:

Street Address:

707 State Road

City: Princeton

State: New Jersey

Country: United States of America Zip: 08540

Additional name(s) & address(es) attached: [ ] Yes [X] No

3. Nature of conveyance/Execution Date(s):

Execution Date(s): in parentheses after inventor name

[X] Assignment [ ] Merger [ ] Change of Name
[ ] Security Agreement [ ] Joint Research Agreement
[ ] Government Interest Assignment
[ ] Executive Order 9424, Confirmatory License
[ ] Other

4. Application or patent number(s):

[ ] This document is being filed together with a new application.

A. Patent Application No.(s)
60/654197

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? [ ] Yes [X] No

5. Name and address to whom correspondence concerning document should be mailed:

Name: Giulio A. DeConti, Jr.
LAHIVE & COCKFIELD, LLP

Internal Address: Atty. Dkt.: MXI-333-1

Street Address: 28 State Street

City: Boston

State: MA Zip: 02109

Phone Number: (617) 227-7400

Fax Number: (617) 742-4214

Email Address:

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 1.21(h) & 3.41) $ 40.00

[ ] Authorized to be charged by credit card
[X] Authorized to be charged to deposit account
[ ] Enclosed
[ ] None required (government interest not affecting title)

8. Payment Information

a. Credit Card Last 4 Numbers
Expiration Date

b. Deposit Account Number 12-0080
Authorized User Name Giulio A. DeConti, Jr.

9. Signature:

Signature — October 28, 2005 Date

Maria Laccotripe Zacharakis, Ph.D., J.D. – 56,266
Name of Person Signing

Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: 3

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to the Patent and Trademark Office, facsimile no. (571) 273-0140 at MS Assignment Recordation Services, Director of the US Patent and Trademark Office, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date shown below.

Dated: October 28, 2005 Signature: (Maria Laccotripe Zacharakis, Ph.D., J.D.)

ASSIGNMENT BY INVENTORS

9

WE, **Josephine M. CARDARELLI** and **Amelia Nancy BLACK**, of San Carlos, California and Los Gatos, California, respectively, in consideration of One Dollar and other valuable consideration paid to us by:

MEDAREX, INC.

a Corporation of New Jersey, having its principal place of business at 707 State Road, Princeton, New Jersey 08540, the receipt of which is hereby acknowledged, do hereby sell, assign and transfer unto said:

MEDAREX, INC.

its successors and assigns, the entire interest for the United States of America and all foreign countries including all rights of priority under the International Convention for the Protection of Industrial Property in a certain invention or improvement in:

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

described in an application:

[ ] Executed by us of even date herewith and about to be filed

or

[x] Application No. 60/654197, filed on February 18, 2005

in the United States Patent and Trademark Office, and in all Letters Patent of the United States and all foreign countries which may or shall be granted on said invention, or any parts thereof, or on said application, or any divisional, continuing, reissue or other applications based in whole or in part thereon. And we agree, for ourselves and our executors and administrators, with said Corporation and its successors and assigns but at its or their expense and charges, hereafter to execute all applications, amended specifications, deed or other instrument, and to do all acts necessary or proper to secure the grant of Letters Patent in the United States and in all other countries to said corporation, with specifications and claims in such form as shall be approved by the counsel of said Corporation and to vest and confirm in said corporation, its successors and assigns, the legal title to all such patents.

And we do hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States to issue such Letters Patent as shall be granted upon said application or applications based thereon to said corporation, its successors and assigns.

And we do further hereby grant the attorneys/agents of Lahive & Cockfield, LLP, the power to insert on this Assignment the filing date and/or application number of said application.

10

Josephine M. Cardarelli

Josephine M. Cardarelli

Date: 9/30/05

United States of America)
State of CA) ss.:
County of Santa Clara)

On this 30th day of September, 2005 before me, the the undersigned notary public, personally appeared Josephine M. Cardarelli (name of document signer), proved to me through satisfactory evidence of identification, which was personally known to me, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document in my presence.

(official signature and seal of notary)

My commission expires 10/25/08

STEPHANIE P. FLORES
Commission # 1522060
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Oct 25, 2008

Amelia Black

Amelia Nancy Black

Amelia Nancy Black

Date: 9/13/05

United States of America)
State of CA) ss.:
County of Santa Clara)

On this 13th day of September, 2005 before me, the the undersigned notary public, personally appeared Amelia Nancy Black (name of document signer), proved to me through satisfactory evidence of identification, which was personally known to me, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document in my presence.

(official signature and seal of notary)

My commission expires 10/25/08

STEPHANIE P. FLORES
Commission # 1522060
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Oct 25, 2008

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 09.04/07a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

ESCUDO DE ARMAS DE LA OFICINA DE PATENTES

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

SUBSECRETARIO DE COMERCIO PARA LA PROPIEDAD INTELECTUAL Y
DIRECTOR DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

30 DE DICIEMBRE DE 2005

PTAS *700221304A*

GIULIO A. DECONTI, JR.
LAHIVE & COCKFIELD, LLP
28 STATE STREET
BOSTON, MA 02109

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACIÓN DE REGISTRO DE DOCUMENTO DE CESIÓN

EL ADJUNTO DOCUMENTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISIÓN DE CESIONES DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA COMPLETA EN MICROFILME BAJO LOS NÚMEROS DE ROLLO Y CUADRO QUE SE MENCIONAN A CONTINUACIÓN ESTÁ DISPONIBLE EN LA SALA DE BÚSQUEDAS DE CESIONES.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACIÓN QUE CONTIENE ESTA NOTIFICACIÓN. LA INFORMACIÓN QUE COMPRENDE ESTA NOTIFICACIÓN DE REGISTRO REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE CESIONES DE MARCAS Y PATENTES. SI USTED ENCUENTRA ALGÚN ERROR O TIENE PREGUNTAS EN RELACIÓN CON ESTA NOTIFICACIÓN, PUEDE CONTACTAR AL FUNCIONARIO CUYO NOMBRE APARECE EN ESTA NOTIFICACIÓN AL 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SU PETICIÓN DE CORRECCIÓN A: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 10/28/2005 ROLLO/CUADRO: 016955/0980

NÚMERO DE PÁGINAS: 3

RESUMEN: CESIÓN DEL INTERÉS DEL CEDENTE (VER DOCUMENTOS PARA INFORMACIÓN).

NÚMERO DE ASUNTO: MXI-333-1

CEDENTE:

CARDARELLI, JOSEPHINE M. FECHA DEL DOC: 09/30/2005

CEDENTE:

BLACK, AMELIA NANCY FECHA DEL DOC: 09/13/2005

CESIONARIO:

MEDAREX, INC.
707 STATE ROAD
PRINCETON, NUEVA JERSEY 08540

NÚMERO DE SERIE: 60654197 FECHA DE PRESENTACIÓN: 02/18/2005

NÚMERO DE PATENTE: FECHA EXPEDICIÓN:

TÍTULO:

016955/0890 PÁGINA 2

LENELL MACKALL, SUPERVISOR
DIVISIÓN DE CESIONES
OFICINA DE REGISTROS PÚBLICOS

FORMATO PTO-1595 (Rev. 10/02)
OMB No. 0651-0027 (exp. 6/30/2008)

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE EE.UU.
Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

CUBIERTA PARA FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN

EXCLUSIVO PARA PATENTES

Al Honorable Comisionado de Marcas y Patentes. Por favor registrar el original de los documentos anexos o copia de los mismos.

1. Nombre de las partes transferentes:
Josephine M. CARDARELLI (09/30/2005) y Amelia Nancy BLACK (09/13/2005)

Se adjuntan los nombres de las partes transferentes adicionales? ☐Sí ☒No

3. Nombre de la Transferencia:

Fecha de suscripción: en paréntesis al pie del nombre del inventor

☒ Cesión ☐ Fusión ☐ Cambio de Nombre

☐ Contrato Garantías ☐Acuerdo Investigación Conjunta

☐ Cesión Interés Gubernamental

☐ Orden Ejecutiva 9424, Licencia Confirmatoria

☐ Otro_____

2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) receptora:

Nombre: MEDAREX, INC.

Dirección Interna: _____

Dirección Externa: _____

707 State Road

Ciudad: Princeton

Estado: Nueva Jersey

País: Estados Unidos de América

Zona Postal: 08540

Se adjuntan nombre(s) y Dirección(es) Adicionales? ☐ Sí ☒ No

4. Número(s) de Solicitud o de Patente:	☐ Este documento se presenta junto con una nueva solicitud.
A. Solicitud de Patente No.(s) 60/654197	B. Patente No.(s)
Números adicionales anexos? ☐Sí ☒ No	

5. Nombre y dirección de la parte a quien se debe enviar la documentación concerniente:

Nombre: Giulio A. DeConti, Jr.
LAHIVE & COCKFIELD, LLP

Dirección Interna: Asunto. Ref. MXI-333-1
Dirección Externa: 28 State Street

Ciudad: Boston

Estado: MA Zona Postal: 02109

Número Teléfono: (617) 227-7400

Número Fax: (617) 742-4214

Dirección electrónica:

6. Número total de solicitudes y patentes involucradas: 1

7. Tasa total (37CFR3.41): $40.00 (Dólares)

☐ Se autoriza que sea cargada a la tarjeta de crédito
☒ Se autoriza a ser cargada a la cuenta de depósito
☐ Adjunta
☐ No se adjunta (interés gubernamental no afecta el título)

8. Información de pago:
a. Tarjeta Crédito Últimos 4 números:
Fecha Vencimiento:

b. Cuenta de Depósito número: 12-0080
Nombre Usuario Autorizado: Giulio A. DeConti, Jr.

NO USE ESTE ESPACIO

9. Firma:

Firma Ilegible
Firma

28 de octubre de 2005
Fecha

Maria Laccotripe Zacharakis, Ph.D., J.D.-56,266
Nombre del signatario

Número total de páginas incluyendo cubierta, adjuntos y documento: 3

Por el presente certifico que este correspondencia se transmite por vía facsimilar a la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, facsímil no. (571) 273-0140 al Servicio de Correo de los Servicios de Inscripción de Cesiones, Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, P.O.Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 an la fecha indicada a continuación.

Fechado: 28 de octubre de 2005 Firma *Firma Ilegible* (Maria Laccotripe Zacharakis, Ph.D., J.D.)

CESIÓN DE LOS INVENTORES

Nosotros, **Josephine M. CARDARELLI** y **Amelia Nancy BLACK**, domiciliadas en San Carlos, California y Los Gatos, California, respectivamente, en contraprestación por la suma de un dólar y de otras contraprestaciones legales pagadas a nosotros por:

MEDAREX, INC.

una sociedad de Nueva Jersey, domiciliada en 707 State Road, Princeton, Nueva Jersey 08540, el recibo de las cuales por el presente se reconoce, por el presente vendemos, cedemos y transferimos a la mencionada:

a sus sucesores y cesionarios, todo el interés para los Estados Unidos de América y para todos los países extranjeros incluyendo todos los derechos de prioridad de conformidad con la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial en una cierta invención o perfeccionamiento en:

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE CARECEN
DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA CD30

descrita en una solicitud:

☐ Suscrita por nosotros en la misma fecha de la presente y a punto de ser presentada

O

☒ Solicitud No. 60/654197, presentada el 18 de febrero de 2005

en la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos así como en todas las patentes de invención de los Estados Unidos y de todos los países extranjeros que puedan o lleguen a ser otorgadas para dicha invención o para cualquier parte de la misma, o para dicha solicitud o para cualquier solicitud divisional, de continuación, de nueva publicación u otras solicitudes basadas total o parcialmente en la misma. Y nos comprometemos, a nombre propio y a nombre de nuestros albaceas testamentarios y administradores con dicha Sociedad y sus sucesores y cesionarios pero por cuenta y cargo de ella o ellos, a suscribir posteriormente todas las solicitudes, reformas especificaciones, escritos u otros instrumentos y a realizar todos los actos que sean necesarios o adecuados para asegurar el otorgamiento de patentes de invención en los Estados Unidos y en todos los demás países a dicha sociedad, con especificaciones y reivindicaciones redactadas de tal forma que sean aprobadas por los asesores legales de dicha Sociedad y a investir y confirmar en dicha

sociedad, sus sucesores y cesionarios, el título legal a todas aquellas patentes.

Y por el presente autorizamos y le solicitamos al Comisionado de Marcas y Patentes de los Estados Unidos a expedir dichas patentes de invención según le puedan ser otorgadas a dicha solicitud o solicitudes con base en las mismas a dicha sociedad, a sus sucesores y cesionarios.

Y adicionalmente por el presente otorgamos a los abogados/agentes de Lahive & Cockfield LLP, poder para inscribir en esta Cesión la fecha de presentación y/o número de solicitud de dicha solicitud.

Firma Ilegible
Josephine M. Cardarelli

Fecha: *9/30/05*

Estados Unidos de América)
Estado de *CA*) Declaración Juramentada
Condado de *Santa Clara*)

Hoy *30* de *Septiembre* de 2005 ante mí, el suscrito notario público, compareció personalmente *Josephine M. Cardarelli* (nombre del signatario del documento), comprobó ante mí por medio de evidencia satisfactoria de identificación, la cual fue *a quién conozco personalmente*, ser la persona cuyo nombre fue firmado en el anterior o adjunto documento en mí presencia.

Firma Ilegible (firma oficial y sello de notario)

Mí comisión vence *10/25/08*

STEPHANIE P. FLORES
Comisión # 1522060
Notario Público - California
Condado de Santa Clara
Mí Comisión vence Oct. 25 de 2008

Firma Ilegible
Amelia Nancy Black

Fecha: *9/13/05*

Estados Unidos de América)
Estado de *CA*) Declaración Juramentada
Condado de *Santa Clara*)

Hoy *13* de *Septiembre* de 2005 ante mí, el suscrito notario público, compareció personalmente *Amelia Nancy Black* (nombre del signatario del documento), comprobó ante mí por medio de evidencia satisfactoria de identificación, la cual fue *a quién conozco personalmente*, ser la persona cuyo nombre fue firmado en el anterior o adjunto documento en mí presencia.

Firma Ilegible (firma oficial y sello de notario)

Mí comisión vence *10/25/08*

STEPHANIE P. FLORES
Comisión # 1522060
Notario Público - California
Condado de Santa Clara
Mí Comisión vence Oct. 25 de 2008

(MXI-333CO)

EN LA OFICINA DE PATENTES DE COLOMBIA

Cesionario(s): **Medarex, Inc.**

Inventor(es): Josephine M. CARDARELLI, *y otros.*

Solicitud No.: US 60/654,197

Presentada el: 18 de febrero de 2005

Título:

CERTIFICACIÓN

Yo, Jane E. Remillard, apoderada del solicitante, por el presente doy fe que el documento adjunto es una copia fiel y exacta de la Cesión suscrita por los inventores **Josephine M. CARDARELLI** y **Amelia Nancy BLACK** inscrita ante la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos el 28 de octubre de 2005 con el Rollo/Cuadro No.

016955/0890. La cesión es de dichos inventores a **Medarex, Inc.**, una sociedad de Nueva Jersey, domiciliada en Nueva Jersey.

Firma Ilegible
Jane E. Remillard
Registro No. 38,872
Apoderado del Solicitante

Estados Unidos de América)
Estado de Massachusetts) Declaración Juramentada
Condado de Suffolk)

Hoy 23 de Julio de 2007 ante mí, el suscrito notario público, compareció personalmente Jane E. Remillard (nombre del signatario del documento), comprobó ante mí por medio de evidencia de identificación satisfactoria, la cual fue que a ella la conozco personalmente, ser la persona cuyo nombre está firmado en el anterior o adjunto documento en mí presencia.

Firma Ilegible (firma oficial y sello notarial)

JACQUELYN SAYA HORNE
Notario Público
Estado de Massachusetts
Mí Comisión Vence
7 de Diciembre de 2012

Jacquelyn Saya Horne
Mí Comisión vence Diciembre 7 de 2012

El Estado de Massachusetts

William Francis Galvin

SECRETARIO DEL ESTADO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *País:* Estados Unidos de América

   Este documento público

2. *ha sido firmado por:* Jacquelyn Saya Horne

3. *actuando en calidad de:* Notario Público

4. *lleva el sello/estampilla de:* el Estado de Massachusetts, *cuya comisión vence el:* 7 de diciembre de 2012

Certificado

5. *en:* Boston, Massachussets 6. *el:* *24* de julio de 2007

7. *por:* el Secretario del Estado

8. *No.:* **1244570**

9. *Sello/Estampilla:* Gran Sello del Estado

10. *Firma:*

Firma ilegible
William Francis Galvin
Secretario del Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.
DVZ\ID-106615\WPCL002G\COLO 16053-841-003-8

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2007 SET -7 P 12:40
JEFE DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.

AUTENTICADO ANTE NOSOTROS EL FUNCIONARIO DEL DESPACHO
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO PRESENTADO PARA LAS FUNCIONES INHERENTES

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Diego Felipe Vargas

COINCIDE CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (LOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 07 SEP 2007

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO
Sexto Encargado

Original - Cliente

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 August 2006 (24.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/089232 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/005854

(22) International Filing Date:
17 February 2006 (17.02.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/654,197 18 February 2005 (18.02.2005) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MEDAREX, INC.** [US/US]; 707 State Road, Princeton, New Jersey 08540 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CARDARELLI, Josephine, M.** [US/US]; 126 Leslie Drive, San Carlos, California 94070 (US). **BLACK, Amelia, Nancy** [GB/US]; 124 Capistrano Place, Los Gatos, California 95035 (US).

(74) Agents: **DECONTI, Giulio, A.** et al.; Lahive & Cockfield, LLP, 28 State Street, Boston, Massachusetts 02109 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/089232 A2

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

(57) Abstract: The invention pertains to anti-CD30 antibodies that lack fucosyl residues. The antibodies of the invention exhibit increased antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity, including the ability to lyse CD30-expressing cell lines that are not lysed by the fucosylated form of the antibodies. The invention also provides host cells that express the anti-CD30 antibodies that lack fucosyl residues, wherein the host cells are deficient for a fucosyl transferase. Methods of using the antibodies to inhibit the growth of CD30+ cells, such as tumor cells, are also provided.

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

Background of the Invention

The CD30 cell surface molecule is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNF-R) superfamily. This family of molecules has variable homology among its members and includes nerve growth factor receptor (NGFR), CD120(a), CD120(b), CD27, CD40 and CD95. These molecules are typically characterized by the presence of multiple cysteine-rich repeats in the extracytoplasmic region (de Bruin, P.C., *et al. Leukemia* 9:1620-1627 (1995)). Members of this family are considered crucial for regulating proliferation and differentiation of lymphocytes.

CD30 is a type I transmembrane glycoprotein with six (human) or three (murine and rat) cysteine-rich repeats with a central hinge sequence. CD30 exists as a 120 kDa membrane molecule which develops from an intercellular precursor protein of 90 kDa. It is shed from the cell surface as a soluble protein (sCD30) of approximately 90 kDa. Shedding of sCD30 occurs as an active process of viable CD30 cells and is not merely caused by the release from dying or dead cells. cDNAs encoding the CD30 protein have been cloned from expression libraries of the HLTV-1 human T-cell line HUT-102 by immunoscreening with monoclonal antibodies Ki-1 and Ber-H2 (Schwab, U., *et al. Nature* 299:65 (1982)). The mouse and rat CD30 cDNA has been found to encode 498 and 493 amino acids, respectively. Human CD30 cDNA encodes an additional 90 amino acids, partially duplicated from one of the cysteine rich domains. The CD30 gene has been mapped to 1p36 in humans and 5q36.2 in rats.

CD30 is preferentially expressed by activated lymphoid cells. Specifically, stimulation of CD30 in lymphoid cells has been shown to induce pleiotropic biological effects, including proliferation, activation, differentiation and cell death, depending on cell type, stage of differentiation and presence of other stimuli (Gruss, H.J. *et al.*, *Blood* 83:2045-2056 (1994)). CD30 was originally identified by the monoclonal antibody Ki-1, which is reactive with antigens expressed on Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease (Schwab *et al.*, *Nature* 299:65 (1982)). Accordingly, CD30 is widely used as a clinical marker for Hodgkin's lymphoma and

related hematological malignancies (Froese *et al.*, *J. Immunol.* 139:2081 (1987); Carde *et al.*, *Eur. J. Cancer* 26:474 (1990)).

CD30 was subsequently shown to be expressed on a subset of non-Hodgkin's lymphomas (NHL), including Burkitt's lymphoma, anaplastic large-cell lymphomas (ALCL), cutaneous T-cell lymphomas, nodular small cleaved-cell lymphomas, lymphocytic lymphomas, peripheral T-cell lymphomas, Lennert's lymphomas, immunoblastic lymphomas, T-cell leukemia/lymphomas (ATLL), adult T-cell leukemia (T-ALL), and entroblastic/centrocytic (cb/cc) follicular lymphomas (Stein *et al.*, *Blood* 66:848 (1985); Miettinen, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:1197 (1992); Piris *et al.*, *Histopathology* 17:211 (1990); Burns *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* 93:327(1990); and Eckert *et al.*, *Am. J. Dermatopathol.* 11:345 (1989)), as well as several virally-transformed lines such as human T-Cell Lymphotrophic Virus I or II transformed T-cells, and Epstein-Barr Virus transformed B-cells (Stein *et al.*, *Blood* 66:848 (1985); Andreesen *et al.*, *Blood* 63:1299 (1984)). In addition, CD30 expression has been documented in embryonal carcinomas, nonembryonal carcinomas, malignant melanomas, mesenchymal tumors, and myeloid cell lines and macrophages at late stages of differentiation (Schwarting *et al.*, Blood 74:1678 (1989); Pallesen *et al.*, Am J. Pathol. 133:446 (1988); Mechtersheimer *et al.*, Cancer 66:1732 (1990); Andreesen *et al.*, Am. J. Pathol. 134:187 (1989)).

Since the percentage of CD30-positive cells in normal individuals is quite small, the expression of CD30 in tumor cells renders it an important target for antibody mediated therapy to specifically target therapeutic agents against CD30-positive neoplastic cells (Chaiarle, R., *et al. Clin. Immunol.* 90(2):157-164 (1999)). Antibody mediated therapy has been shown to increase cytotoxicity of CD30-positive cells by both complement activation and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (Pohl C., *et al.* Int J Cancer 54:418 (1993)). However, while the results obtained to date clearly establish CD30 as a useful target for immunotherapy, they also show that currently available murine antibodies do not constitute ideal therapeutic agents. Passive antibody therapy has not been effective *in vitro* or *in vivo* against patients with refractory Hodgkin's disease. A clinical trial of the anti-CD30 antibody Ber-H2 showed localization of the antibody, but no responses (Falini B. *et al.*(1992) *Brit J Haematol.* 82:38-45; Koon, H.B. *et al.* (2000) *Curr Opin in Oncol.* 12:588-593). Through coupling of an anti-CD30 antibody to a deglycosylated Ricin toxin-A chain toxin, cytotoxicity was shown in the treatment of human Hodgkin's

Disease in a SCID mouse model, although grade 3 toxicities were also seen in the subjects (Schell, R. *et al.* (2002) *Annals of Oncology* 13:57-66).

Accordingly, the need exists for improved therapeutic antibodies against CD30 which are more effective for treating and/or preventing diseases mediated by CD30.

Summary of the Invention

The present invention provides isolated defucosylated antibodies (*i.e.*, antibodies lacking fucose residues) that bind to human CD30 and exhibit enhanced antibody directed cellular cytotoxic (ADCC) killing of CD30-expressing cells, as compared to the non-defucosylated form of the antibody (*i.e.*, antibodies containing fucose residues). Also provided are methods for treating a variety of diseases involving CD30 expression using the antibodies and compositions of the invention.

In one aspect, the invention pertains to an isolated defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds to human CD30 with a K_D of $10x10^{-8}$ M or less, more preferably $1x10^{-8}$ M or less, more preferably $5x10^{-9}$ or less or even more preferably, $1x10^{-9}$ or less.

The defucosylated antibodies of the present invention bind to CD30 and inhibit the growth of cells expressing CD30 by enhancing antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in the presence of human effector cells (*e.g.*, monocytes or mononuclear cells), as compared to the fucosylated form of the antibody. In one embodiment, the defucosylated antibody mediates increased ADCC of cells expressing CD30 in the presence of human effector cells but not in the presence of mouse effector cells.

In a preferred embodiment, a defucosylated antibody of the invention induces ADCC of L1236 cells *in vitro* wherein the fucosylated form of the antibody does not induce ADCC, under conditions of an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target cell to effector cell ratio of 1:50. In another preferred embodiment, a defucosylated antibody of the invention enhances ADCC of L540, L428 and Karpas cells *in vitro* compared to the fucosylated form of the antibody, under conditions of an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target cell to effector cell ratio of 1:50. Accordingly, the antibodies of the present invention provide an improved means for treating disorders characterized by CD30 expression.

Preferably, the defucosylated antibody of the invention is a monoclonal antibody. In one aspect, the invention pertains to a humanized or chimeric monoclonal antibody. Preferably, the humanized or chimeric antibody is prepared from a mouse anti-CD30 antibody selected from the group consisting of: AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, Ber-H8. In another aspect, the invention pertains to a human monoclonal antibody.

In one embodiment of the invention, the human monoclonal antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2 and 3; and

(b) a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 5 and 6.

wherein the antibody binds CD30 and lacks fucose residues.

A preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4.

Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5.

Another preferred combination comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; and

(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.

In another aspect, the invention provides a defucosylated anti-CD30 antibody comprising:

a heavy chain variable region that comprises CDR1, CDR2, and CDR3 sequences; and a light chain variable region that comprises CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein:

(a) the heavy chain variable region CDR1 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 7, 8, and 9;

(b) the heavy chain variable region CDR2 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 10, 11, and 12;

(c) the heavy chain variable region CDR3 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 13, 14, and 15;

(a) the light chain variable region CDR1 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 16, 17, and 18;

(a) the light chain variable region CDR2 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 19, 20, and 21; and

(a) the light chain variable region CDR3 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs: 22, 23, and 24;

wherein the antibody binds CD30 and lacks fucose residues.

A preferred combination comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:7;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:10;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:13;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:16;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:19; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:22.

Another preferred combination comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:8;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:11;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:14;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:17;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:20; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:23.

Yet another preferred combination comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:9;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:12;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:15;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:18;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:21; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:24.

In another aspect, the invention provides a defucosylated human anti-CD30 antibody which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 4-34 or V_H 3-07 gene. The invention also provides a defucosylated human anti-CD30 antibody which comprises a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L15, A27 or L6 gene. The invention still further provides a defucosylated human anti-CD30 antibody which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 4-34 or V_H 3-07 gene and a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L15, A27 or L6 gene.

In another aspect, the invention pertains to a host cell comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding an anti-CD30 antibody, wherein said host cell lacks a fucosyltransferase such that the anti-CD30 antibody expressed by said host cell lacks fucose residues. Preferably, the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes. Preferably, the fucosyltransferase is FUT8. Preferably, the host cell is a CHO cell.

In another aspect, the invention provides a method of inhibiting growth of $CD30^+$ cells. The method involves contacting the cells with a defucosylated anti-CD30 antibody under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of said cells. The cells can be, for example, tumor cells. Preferably, the anti-CD30 antibody is a human antibody.

The invention also provides a method of inhibiting growth of tumor cells expressing CD30 in a subject. The method involves administering to the subject a defucosylated anti-CD30 antibody in an amount effective to inhibit growth of tumor cells expressing CD30 in the subject. Preferably, the anti-CD30 antibody is a human antibody. In preferred embodiments, the tumor cells are Hodgkin's Disease (HD) tumor cells or anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) tumor cells.

Other features and advantages of the instant invention will be apparent from the following detailed description and examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, Genbank entries, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

Brief Description of the Drawings

Figure 1A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 30) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 1) of the heavy chain variable region of the 5F11 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 7), CDR2 (SEQ ID NO: 10) and CDR3 (SEQ ID NO: 13) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 1B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 33) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 4) of the light chain variable region of the 5F11 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 16), CDR2 (SEQ ID NO: 19) and CDR3 (SEQ ID NO: 22) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 2A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 31) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 2) of the heavy chain variable region of the 17G1 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 8), CDR2 (SEQ ID NO: 11) and CDR3 (SEQ ID NO: 14) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 2B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 34) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 5) of the light chain variable region of the 17G1 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 20) and CDR3 (SEQ ID NO: 23) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 3A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 32) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 3) of the heavy chain variable region of the 2H9 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 12) and CDR3 (SEQ ID NO: 15) regions are delineated and the V, D, and J germline derivations are indicated.

Figure 3B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 35) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 6) of the light chain variable region of the 2H9 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 21) and CDR3 (SEQ ID NO: 24) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 4 is a graph showing the cytotoxic cell killing activity of the fucosylated and defucosylated forms of 5F11 on the L540 human Hodgkin's lymphoma cell line, as compared to an isotype-matched control antibody (1D4).

Figure 5 is a graph showing the cytotoxic cell killing activity of the fucosylated and defucosylated forms of 5F11 on the L428 human Hodgkin's lymphoma cell line, as compared to an isotype-matched control antibody (1D4).

Figure 6 is a graph showing the cytotoxic cell killing activity of the fucosylated and defucosylated forms of 5F11 on the L1236 human Hodgkin's lymphoma cell line, as compared to an isotype-matched control antibody (1D4).

Figure 7 is a graph showing the cytotoxic cell killing activity of the fucosylated and defucosylated forms of 5F11 on the Karpas human T cell lymphoma cell line, as compared to an isotype-matched control antibody (1D4).

Figures 8A-8B show the amino acid sequences of the human germlines V_H 3-11, V_K L15, V_K A27, and V_K L6 (SEQ ID NOs:25-29, respectively), the CDRs are delineated.

Figure 9 is a graph showing blockade of ADCC activity with an anti-CD16 antibody.

Figure 10 is a graph showing the cytotoxic cell killing activity of the fucosylated and defucosylated forms of 5F11 in the presence of mouse (left panel) or human (right panel) effector cells.

Figure 11 is a graph showing an ADCC assay using cynomolgus blood.

Detailed Description of the Invention

The present invention provides antibody compositions and improved associated with CD30 and/or CD30 expressing cells. The antibodies of the invention lack fucosyl residues on the antibody carbohydrate chains. Furthermore, the antibodies exhibit enhanced antibody directed cellular cytotoxic (ADCC) killing of CD30+ cells. In a particular embodiment, the antibody of the current invention is capable of killing CD30+ cells under conditions in which the fucosylated form of the antibody would not effectively kill CD30+ cells. In another embodiment, the antibody of the current invention enhances killing of CD30+ cells compared to the fucosylated form of the antibody. In one embodiment, the antibodies of the present invention are fully human antibodies and are particularly useful for the therapeutic treatment in humans of disorders associated with CD30 expressing cells. Methods of using anti-CD30 antibodies lacking fucosyl residues for therapeutic treatment (*e.g.*, to treat and/or prevent diseases associated with expression of CD30) are also encompassed by the invention.

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms will be defined as follows. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

The terms "CD30" and "CD30 antigen" are used interchangeably herein, and include any variants, isoforms and species homologs of human CD30 which are naturally expressed by cells. The complete amino acid sequence of human CD30 protein has the Genbank accession number NP_001234. The complete cDNA sequence encoding the human CD30 protein has the Genbank accession number NM_001243.

As used herein, the terms "antibody that lacks fucose residues" and "defucosylated antibody" are used interchangeably and are intended to refer to an antibody in which the carbohydrate portion of the antibody does not contain a fucosyl residue or from which the fucosyl residue has been removed. An antibody that lacks

fucose residues can be generated, for example, by expression of the antibody in a cell or expression system that minimizes or does not attach fucosyl residues to the antibody carbohydrate chain, or by chemical modification of the antibody to remove fucosyl residues from the carbohydrate chain (*e.g.*, treatment of the antibody with a fucosidase). As such, the terms "lacks fucose residues" and "defucosylated" are not intended to be limited by the mechanism by which the antibody with altered carbohydrate structure is prepared.

As used herein, the term "antibody expressing fucose residues" and "fucosylated antibody" are used interchangeably and are intended to refer to an antibody in which the carbohydrate portion of the antibody contains fucose.

The term "immune response" refers to the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

As used herein, the term "effector cell" refers to an immune cell which is involved in the effector phase of an immune response, as opposed to the cognitive and activation phases of an immune response. Exemplary immune cells include a cell of a myeloid or lymphoid origin, *e.g.*, lymphocytes (*e.g.*, B cells and T cells including cytolytic T cells (CTLs)), killer cells, natural killer cells, macrophages, monocytes, eosinophils, neutrophils, polymorphonuclear cells, granulocytes, mast cells, and basophils. Some effector cells express specific Fc receptors and carry out specific immune functions. In preferred embodiments, an effector cell is capable of inducing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), *e.g.*, a neutrophil capable of inducing ADCC. For example, monocytes and macrophages, which express FcR are involved in specific killing of target cells and presenting antigens to other components of the immune system, or binding to cells that present antigens. In other embodiments, an effector cell can phagocytose a target antigen or target cell. The expression of a particular FcR on an effector cell can be regulated by humoral factors such as cytokines. For example, expression of FcαRI has been found to be up-regulated by G-CSF or GM-CSF. This enhanced expression increases the effector

function of FcαRI-bearing cells against targets. An effector cell can phagocytose or lyse a target antigen or a target cell.

"Target cell" refers to any cell or pathogen whose elimination would be beneficial in a subject (*e.g.*, a human or animal) and that can be targeted by a composition (*e.g.*, antibody) of the invention. For example, the target cell can be a cell expressing or overexpressing CD30.

The term "antibody-dependent cellular cytotoxicity" or "ADCC" refers to a cell-mediated cytotoxic reaction in which a CD30+ target cell with bound anti-CD30 antibody is recognized by an effector cell bearing Fc receptors and is subsequently lysed without requiring the involvement of complement.

As used herein, the term "enhances ADCC" (*e.g.*, referring to cells) is intended to include any measurable increase in cell lysis when contacted with an anti-CD30 antibody lacking fucosyl residues as compared to the cell killing of the same cell in contact with a fucosylated anti-CD30 antibody in the presence of effector cells (for example, at a ratio of target cells:effector cells of 1:50), *e.g.*, an increase in cell lysis by at least about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, or 325%.

The term "antibody" as referred to herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chains thereof. An "antibody" refers to a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, or an antigen binding portion thereof. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, C_{H1}, C_{H2} and C_{H3}. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L. The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the

immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (Clq) of the classical complement system.

The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, CD30). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L, V_H, C_L and C_{H1} domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and C_{H1} domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); *see e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve

splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

The term "human antibody", as used herein, is intended to refer to antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies of the invention may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*).

The term "human monoclonal antibody" refers to antibodies displaying a single binding specificity which have variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal, *e.g.*, a transgenic mouse, having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene fused to an immortalized cell. The term "human monoclonal antibody", as used herein, also includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial

human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

An "isolated antibody," as used herein, is intended to refer to an antibody which is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds to CD30 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than CD30). An isolated antibody that specifically binds to an epitope, isoform or variant of human CD30 may, however, have cross-reactivity to other related antigens, *e.g.*, from other species (*e.g.*, CD30 species homologs). Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals. In one embodiment of the invention, a combination of "isolated" monoclonal antibodies having different specificities are combined in a well defined composition.

The term "humanized antibody" is intended to refer to antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences. Additional framework region modifications may be made within the human framework sequences.

The term "chimeric antibody" is intended to refer to antibodies in which the variable region sequences are derived from one species and the constant region sequences are derived from another species, such as an antibody in which the variable region sequences are derived from a mouse antibody and the constant region sequences are derived from a human antibody.

The term "epitope" means a protein determinant capable of specific binding to, or specific binding by, an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge

characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

As used herein, "specific binding" refers to antibody binding to a predetermined antigen. Typically, the antibody binds with a dissociation constant (K_D) of 10^{-7} M or less, and binds to the predetermined antigen with a K_D that is at least two-fold less than its K_D for binding to a non-specific antigen (*e.g.*, BSA, casein) other than the predetermined antigen or a closely-related antigen. The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen".

As used herein, "isotype" refers to the antibody class (*e.g.*, IgM or IgGl) that is encoded by heavy chain constant region genes.

The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The term "recombinant host cell" (or simply "host cell"), as used herein, is intended to refer to a cell into which a recombinant expression vector has been

introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein. Recombinant host cells include, for example, CHO cells, transfectomas, and lymphocytic cells.

As used herein, the term "subject" includes any human or nonhuman animal. The term "nonhuman animal" includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as nonhuman primates, sheep, dogs, cats, horses, cows, chickens, amphibians, reptiles, etc.

The terms "transgenic, nonhuman animal" refers to a nonhuman animal having a genome comprising one or more human heavy and/or light chain transgenes or transchromosomes (either integrated or non-integrated into the animal's natural genomic DNA) and which is capable of expressing fully human antibodies. For example, a transgenic mouse can have a human light chain transgene and either a human heavy chain transgene or human heavy chain transchromosome, such that the mouse produces human anti-CD30 antibodies when immunized with CD30 antigen and/or cells expressing CD30. The human heavy chain transgene can be integrated into the chromosomal DNA of the mouse, as is the case for transgenic, *e.g.*, HuMAb mice, or the human heavy chain transgene can be maintained extrachromosomally, as is the case for transchromosomal (*e.g.*, KM) mice as described in WO 02/43478. Such transgenic and transchromosomal mice are capable of producing multiple isotypes of human monoclonal antibodies to CD30 (*e.g.*, IgG, IgA and/or IgE) by undergoing V-D-J recombination and isotype switching.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.

Anti-CD30 Antibodies Lacking Fucose Residues and Having Enhanced ADCC Activity

The present invention relates to a defucosylated anti-CD30 antibody with enhanced antibody directed cellular cytotoxicity (ADCC) against cells expressing CD30 as compared to the fucosylated form of the antibody. In a preferred

embodiment, a defucosylated antibody of the invention induces ADCC of L1236 cells *in vitro* wherein the fucosylated form of the antibody does not induce ADCC, under conditions of an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target cell to effector cell ratio of 1:50. In another preferred embodiment, a defucosylated antibody of the invention enhances ADCC of L540, L428 and Karpas cells *in vitro* compared to the fucosylated form of the antibody, under conditions of an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target cell to effector cell ratio of 1:50.

The increased ADCC activity of a defucosylated antibody of the invention can be quantitated, for example, as an increase in percent cell lysis, as compared to the fucosylated form of the antibody, when ADCC activity is measured under the same conditions for the defucosylated and fucosylated forms (*e.g.*, same antibody concentrations and same target to effector cell ratios). Preferably, a defucosylated anti-CD30 antibody of the invention increases the percent lysis of CD30+ cells as compared to the fucosylated form of the antibody at least 1.25 fold (*i.e.*, the ratio of the % lysis of the defucosylated form to the fucosylated form is at least 1.25), more preferably at least 2 fold, even more preferably at least 2.5 fold and even more preferably at least 3 fold. In various embodiments, the defucosylated form of the antibody increases percent lysis of CD30+ cells as compared to the fucosylated form of the antibody from 1.25 to 3.25 fold, preferably 1.5 to 3.25 fold, even more preferably 1.61 to 3.25 fold, even more preferably 2.15 to 3.25 fold, and even more preferably 2.63 to 3.25 fold, preferably under conditions where the antibody is at a concentration of 25 μg/ml and the target to effector cell ratio is 1:50.

Additionally or alternatively, the increased ADCC activity of a defucosylated antibody of the invention can be quantitated, for example, as an increased potency as measured by a decrease in the EC_{50} value for the defucosylated form, as compared to the fucosylated form. This can be quantitated by the ratio of the EC_{50} for the fucosylated form to the defucosylated form. Preferably, the EC_{50} ratio of the fucosylated form to the defucosylated form for ADCC of CD30+ cells is at least 3 (*i.e.*, the EC_{50} of the defucosylated form is 3-fold lower than the EC_{50} of the fucosylated form), more preferably, at least 4, even more preferably at least 5, at least 7, at least 10, at least 15 or at least 20. In various embodiments, the EC_{50} ratio of the fucosylated form to the defucosylated form for ADCC of CD30+ cells is from 2 to 27.1, more preferably from 4 to 27.1, even more preferably from 4.7 to 27.1, even

more preferably from 7.8 to 27.1, and even more preferably from 11.1 to 27.1. Preferably, the EC50 values are determined in ADCC assays that use a target to effector cell ratio of 1:50 and antibody concentrations from 0.0001 μg/ml to 10 μg/ml or higher.

Examples of CD30+ cell lines that can be used in the ADCC assays of the invention and against which a defucosylated antibody of the invention exhibits enhanced ADCC activity, as compared to the fucosylated form of the antibody, include L540 cells (human Hodgkin's lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 72), L428 cells (human Hodgkin's lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 197), L1236 cells (human Hodgkin's lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 530), and Karpas cells (human T cell lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 31). The enhanced ADCC effect by defucosylated anti-CD30 antibodies may result in ADCC activity on CD30+ cells at antibody concentrations where ADCC would not be observed with the fucosylated form of the antibody. For example, in an *in vitro* ADCC assay with a target:effector cell ratio of 1:50, ADCC due to a defucosylated anti-CD30 antibody is observed with the CD30+ cell line L1236 at concentrations as low as 0.005 μg/ml, whereas no ADCC activity is detected with the fucosylated anti-CD30 antibody at concentrations as high as 0.1 μg/ml.

Defucosylation of Anti-CD30 Antibodies

Anti-CD30 antibodies (*e.g.*, murine, chimeric, humanized and human antibodies) are known in the art, and may be used in the present invention. The anti-CD30 antibody of the present invention is modified such that the antibody is lacking in fucosyl residues. An antibody can be made that is lacking in fucosyl residues by one of a variety of methods. For example, the antibody can be expressed, using recombinant DNA technology, in a cell with an altered glycosylation mechanism such that addition of fucosyl residues to carbohydrate chains is inhibited. Additionally or alternatively, an antibody can be defucosylated through chemical removal of the fucosyl residue.

In one embodiment, the antibody is expressed in a cell that is lacking in a fucosyltransferase enzyme such that the cell line produces proteins lacking fucose in their carbohydrates. For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (alpha (1,6) fucosyltransferase), such that antibodies

expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 FUT8$^{-/-}$ cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (see U.S. Patent Publication No. 20040110704 by Yamane *et al.* and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). As another example, EP 1,176,195 by Hanai *et al.* describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the alpha 1,6 bond-related enzyme. Hanai *et al.* also describe cell lines which naturally have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835 by Presta describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). PCT Publication WO 99/54342 by Umana *et al.* describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (*e.g.*, beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNac structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

In another embodiment, an anti-CD30 antibody is expressed and the fucosyl residue(s) is cleaved using a fucosidase enzyme. For example, the fucosidase alpha-L-fucosidase removes fucosyl residues from antibodies (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Additionally, in other embodiments, other forms of glycosylation of an antibody are also modified. For example, an aglycoslated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861 by Co *et al.*

Characterization of Absence of Fucosyl Residues on Anti-CD30 Antibodies

Antibodies of the invention lack fucosyl residues, for example in the Fc portion carbohydrate chain. Antibodies can be tested for the absence of fucosyl residues using standard techniques known in the art, such as APTS capillary electrophoresis laser induced fluorescence. Briefly, the N-linked oligosaccharides of the purified anti-CD30 antibody can be released by adding the peptide N-glycanase (Prozyme) and incubating overnight. The carbohydrates are resuspended and derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) under mild reductive amination conditions in which desialylation and loss of fucosyl residues is minimized. The reaction adducts are analyzed by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence detector (Beckman Coulter). An absence of fucose can be observed by a shift in the electrophoresis compared to the same antibody containing fucose. Another technique for testing the absence of fucose on anti-CD30 antibodies is a monosaccharide analysis using HPLC. Suitable assays to determine CD30 binding are further described in the Examples.

Characterization of Antibody Dependent Cell Killing of CD30+ Cells

Defucosylated anti-CD30 antibodies can be tested for their ability to mediate phagocytosis and killing of cells expressing CD30. In one embodiment, a defucosylated anti-CD30 antibody enhances killing of cells expressing CD30 in comparison to the same antibody containing fucose when compared at the same concentration. In another embodiment, a defucosylated anti-CD30 antibody induces killing of cells expressing CD30 where the same antibody containing fucose does not induce cell killing at the same concentration.

The ADCC activity of a monoclonal antibody can be tested in established *in vitro* assays. As an example, a chromium release ADCC assay may be used. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), or other effector cells, from healthy donors can be purified by Ficoll Hypaque density centrifugation, followed by lysis of contaminating erythrocytes. Washed PBMCs can be suspended in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and mixed with ^{51}Cr labeled cells expressing CD30, at various ratios of effector cells to tumor cells (effector cells:tumor cells). Anti-CD30 antibody can then be added at various concentrations. An isotype matched antibody can be used as a negative control. Assays can be carried

out for 4-18 hours at 37° C. Samples can be assayed for cytolysis by measuring ^{51}Cr release into the culture supernatant. Anti-CD30 monoclonal can also be tested in combinations with each other to determine whether cytolysis is enhanced with multiple monoclonal antibodies.

An alternative assay that can be used to test for anti-CD30 antibody ability to mediate phagocytosis and killing of cells expressing CD30 is a time resolved fluorometry assay. Briefly, CD30 expressing cells are loaded with an acetoxymethyl ester of fluorescence enhancing ligand (BATDA), which penetrates cell membranes. Inside the cell, the ester bonds are hydrolized and the compound can no longer pass the cell membrane. Anti-CD30 antibody can then be added at various concentrations. Following cytolysis, an europeum solution (Perkin Elmer) is added and any free ligand binds the europeum to form a highly fluorescent and stable chelate (EuTDA) that can be read on a microplate reader (Perkin Elmer). The measured signal correlates with the amount of lysed cells.

Anti-CD30 antibodies also can be tested in an *in vivo* model (*e.g.*, in mice) to determine their efficacy in mediating phagocytosis and killing of cells expressing CD30, *e.g.*, tumor cells. These antibodies can be selected, for example, based on the following criteria, which are not intended to be exclusive:

1) binding to live cells expressing CD30;

2) high affinity of binding to CD30;

3) binding to a unique epitope on CD30 (to eliminate the possibility that monoclonal antibodies with complimentary activities when used in combination would compete for binding to the same epitope);

4) opsonization of cells expressing CD30;

5) mediation *in vitro* of growth inhibition, phagocytosis and/or killing of cells expressing CD30 in the presence of human effector cells.

Preferred monoclonal antibodies of the invention meet one or more of these criteria. In a particular embodiment, the monoclonal antibodies are used in combination, *e.g.*, as a pharmaceutical composition comprising two or more anti-CD30 monoclonal antibodies or fragments thereof. For example, anti-CD30 monoclonal antibodies having different, but complementary activities can be combined in a single therapy to achieve a desired therapeutic or diagnostic effect. An illustration of this would be a composition containing an anti-CD30 monoclonal antibody that mediates highly effective killing of target cells in the presence of

effector cells, combined with another anti-CD30 monoclonal antibody that inhibits the growth of cells expressing CD30.

Characterization of Binding to CD30

Antibodies of the invention can be tested for binding to CD30 by, for example, standard assays known in the art, such as ELISA, FACS analysis and/or Biacore analysis. In a typical ELISA assay, briefly, microtiter plates are coated with purified CD30 at 0.25 μg/ml in PBS, and then blocked with 5% bovine serum albumin in PBS. Dilutions of antibody are added to each well and incubated for 1-2 hours at 37°C. The plates are washed with PBS/Tween and then incubated with secondary reagent (*e.g.*, for human antibodies or a goat-anti-human IgG Fc-specific polyclonal reagent) conjugated to alkaline phosphatase for 1 hour at 37°C. After washing, the plates are developed with pNPP substrate (1 mg/ml), and analyzed at OD of 405-650.

In order to demonstrate binding of monoclonal antibodies to live cells expressing the CD30, flow cytometry can be used. In a typical (but non-limiting) example of a flow cytometry protocol, cell lines expressing CD30 (grown under standard growth conditions) are mixed with various concentrations of monoclonal antibodies in PBS containing 0.1% BSA and 20% mouse serum, and incubated at 37°C for 1 hour. After washing, the cells are reacted with Fluorescein-labeled secondary antibody (e.g., anti-human IgG antibody) under the same conditions as the primary antibody staining. The samples can be analyzed by a FACScan instrument using light and side scatter properties to gate on single cells. An alternative assay using fluorescence microscopy may be used (in addition to or instead of) the flow cytometry assay. Cells can be stained exactly as described above and examined by fluorescence microscopy. This method allows visualization of individual cells, but may have diminished sensitivity depending on the density of the antigen.

Anti-CD30 antibodies can be further tested for reactivity with CD30 antigen by Western blotting. For example, cell extracts from cells expressing CD30 can be prepared and subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the separated antigens are transferred to nitrocellulose membranes, blocked with 20% mouse serum, and probed with the monoclonal antibodies to be tested. Antibody binding can be detected using anti-

species specific secondary antibody linked to alkaline phosphatase and developed with BCIP/NBT substrate tablets (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Other techniques for evaluating the binding ability of antibodies towards CD30 are known in the art, including RIAs and Biacore analysis. Suitable assays to determine CD30 binding are described in detail in the Examples.

Chimeric or Humanized Anti-CD30 Antibodies

In certain embodiments, a defucosylated anti-CD30 antibody of the invention is a chimeric or humanized antibody. Such antibodies can be prepared using mouse anti-CD30 antibodies that are available in the art and established procedures for converting a mouse antibody to a chimeric or humanized antibody. Non-limiting examples of such mouse anti-CD30 antibodies include the AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 and Ber-H8 monoclonal antibodies. Moreover, humanized anti-CD30 antibodies are described in PCT Publication WO 02/4661.

Human Monoclonal Anti-CD30 Antibodies

Preferred antibodies of the invention include human anti-CD30 monoclonal antibodies. Examples of human anti-CD30 monoclonal antibodies include the 5F11, 17G1, and 2H9 antibodies, isolated and structurally characterized as originally described in PCT Publication WO 03/059282. The V_H amino acid sequences of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 1, 2, and 3, respectively. The V_L amino acid sequences of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 4, 5, and 6, respectively.

Given that each of these antibodies can bind to CD30, the V_H and V_L sequences can be "mixed and matched" to create other anti-CD30 binding molecules of the invention. CD30 binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using the binding assays well known in the art, such as FACS analysis and ELISA assays. Preferably, when V_H and V_L chains are mixed and matched, a V_H sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_H sequence. Likewise, preferably a V_L sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_L sequence. For example, the V_H sequences of 5F11 and 2H9 are particularly amenable for mixing and matching, since these

antibodies use V_H sequences derived from the same germline sequence (V_H 4-34) and thus they exhibit structural similarity.

In particular embodiments, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising:

(a) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2, and 3; and

(b) a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 4, 5, and 6;

wherein the antibody specifically binds human CD30.

Preferred heavy and light chain combinations include:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.

In another aspect, the invention provides defucosylated antibodies that comprise the heavy chain and light chain CDR1s, CDR2s and CDR3s of 5F11, 17G1, and 2H9, or combinations thereof. The amino acid sequences of the V_H CDR1s of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 7, 8, and 9, respectively. The amino acid sequences of the V_H CDR2s of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 10, 11, and 12, respectively. The amino acid sequences of the V_H CDR3s of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 13, 14, and 15, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR1s of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 16, 17, and 18, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR2s of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 19, 20, and 21, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR3s of 5F11, 17G1, and 2H9 are shown in SEQ ID NOs: 22, 23, and 24, respectively. The CDR regions are delineated using the Kabat system (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Given that each of these antibodies can bind to CD30 and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, 2 and 3 regions, the V_H CDR1, 2 and 3 sequences and V_k CDR1, 2 and 3 sequences can be "mixed and matched" (*i.e.*, CDRs from different antibodies can be mixed and match, although each antibody must contain a V_H CDR1, 2 and 3 and a V_k CDR1, 2 and 3) to create other anti-CD30 binding molecules of the invention. CD30 binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using binding assays know in the art, for example, FACS analysis and ELISA assays. Preferably, when V_H CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_H sequence is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when V_k CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_k sequence preferably is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan that novel V_H and V_L sequences can be created by substituting one or more V_H and/or V_L CDR region sequences with structurally similar sequences from the CDR sequences disclosed herein for monoclonal antibodies antibodies 5F11, 17G1, and 2H9.

Accordingly, in another aspect, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7, 8, and 9;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 11, and 12;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13, 14, and 15;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 16, 17, and 18;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 20, and 21; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 22, 23, and 24;

wherein the antibody specifically binds CD30.

In a preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 7;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 10;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 13;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 16;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 19; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 22.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 8;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 11;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 14;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 17;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 20; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 24.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 9;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 12;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 15;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 21; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 24.

Antibodies Having Particular Germline Sequences

In certain embodiments, a defucosylated antibody of the invention comprises a heavy chain variable region from a particular germline heavy chain immunoglobulin gene and/or a light chain variable region from a particular germline light chain immunoglobulin gene.

For example, in a preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-34 gene, wherein the antibody specifically binds to human CD30. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-07 gene, wherein the antibody specifically binds CD30. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L15

gene, wherein the antibody specifically binds to human CD30. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K A27 gene, wherein the antibody specifically binds to human CD30. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene, wherein the antibody specifically binds to human CD30.

In yet another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody:

(a) comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-34 or 3-07 gene (which encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 25 and 26, respectively);

(b) comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_k L15, A27, or L6 gene (which encode the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 27, 28, and 29, respectively); and

(c) specifically binds to human CD30.

A preferred V_H and V_k germline combination is V_H 4-34 and V_k L15. An example of an antibody having V_H and V_K of V_H 4-34 and V_k L15, respectively, is the 5F11 antibody. Another preferred V_H and V_k germline combination is V_H 3-07 and V_k A27. An example of an antibody having V_H and V_k of V_H 3-07 and Vk A27, respectively, is the 17G1 antibody. Another preferred V_H and V_k germline combination is V_H 4-34 and V_k L6. An example of an antibody having V_H and V_k of V_H 4-34 and V_k L6, respectively, is the 2H9 antibody.

As used herein, a human antibody comprises heavy or light chain variable regions that is "the product of" or "derived from" a particular germline sequence if the variable regions of the antibody are obtained from a system that uses human germline immunoglobulin genes. Such systems include immunizing a transgenic mouse carrying human immunoglobulin genes with the antigen of interest or screening a human immunoglobulin gene library displayed on phage with the antigen of interest. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a human germline immunoglobulin sequence can be identified as such by comparing the amino acid sequence of the human antibody to the amino acid sequences of human germline immunoglobulins (eg., using the Vbase database) and selecting the human germline

immunoglobulin sequence that is closest in sequence (*i.e.*, greatest % identity) to the sequence of the human antibody. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a particular human germline immunoglobulin sequence may contain amino acid differences as compared to the germline sequence, due to, for example, naturally-occurring somatic mutations or intentional introduction of site-directed mutation. However, a selected human antibody typically is at least 90% identical in amino acids sequence to an amino acid sequence encoded by a human germline immunoglobulin gene and contains amino acid residues that identify the human antibody as being human when compared to the germline immunoglobulin amino acid sequences of other species (*e.g.*, murine germline sequences). In certain cases, a human antibody may be at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98%, or 99% identical in amino acid sequence to the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene. Typically, a human antibody derived from a particular human germline sequence will display no more than 10 amino acid differences from the amino acid sequence encoded by the human germline immunoglobulin gene. In certain cases, the human antibody may display no more than 5, or even no more than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene.

Homologous Antibodies

In yet another embodiment, a defucosylated antibody of the invention comprises heavy and light chain variable regions comprising amino acid sequences that are homologous to the amino acid sequences of the preferred antibodies described herein, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-CD30 antibodies of the invention.

For example, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein:

(a) the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2, and 3;

(b) the light chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 5, and 6; and

(c) the antibody specifically binds to human CD30.

In other embodiments, the V_H and/or V_L amino acid sequences may be 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homologous to the sequences set forth above. An antibody having V_H and V_L regions having high (*i.e.*, 80% or greater) homology to the V_H and V_L regions of the sequences set forth above, can be obtained by mutagenesis (*e.g.*, site-directed or PCR-mediated mutagenesis) of one or more nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 1-6, followed by testing of the encoded altered antibody for retained function (*i.e.*, binding to CD30) using the binding assays described herein. Nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 1-6 are shown in SEQ ID NOs: 30-35.

As used herein, the percent homology between two amino acid sequences is equivalent to the percent identity between the two sequences. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % homology = # of identical positions/total # of positions x 100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm, as described in the non-limiting examples below.

The percent identity between two nucleotide sequences can be determined using the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. The percent identity between two nucleotide or amino acid sequences can also determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at

http://www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

The percent identity between two amino acid sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

Additionally or alternatively, the protein sequences of the present invention can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify related sequences. Such searches can be performed using the XBLAST program (version 2.0) of Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to the antibody molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Antibodies with Conservative Modifications

In certain embodiments, a defucosylated antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, wherein one or more of these CDR sequences comprise specified amino acid sequences based on the preferred antibodies described herein (*e.g.*, 5F11, 17G1, and 2H9), or conservative modifications thereof, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-CD30 antibodies of the invention. Accordingly, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and

CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein:

(a) the heavy chain variable region CDR3 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9, 12, or 15, and conservative modifications thereof;

(b) the light chain variable region CDR3 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18, 21, or 24, and conservative modifications thereof; and

(c) the antibody specifically binds to human CD30.

In a preferred embodiment, the heavy chain variable region CDR2 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, 11, or 14, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR2 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17, 20, or 23, and conservative modifications thereof. In another preferred embodiment, the heavy chain variable region CDR1 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7, 10, or 13, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR1 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16, 19, or 22, and conservative modifications thereof.

As used herein, the term "conservative sequence modifications" is intended to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into an antibody of the invention by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative amino acid substitutions are ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid residues within the CDR regions of an antibody of the invention

can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered antibody can be tested for retained function (*i.e.*, the functions set forth in (i) through (iv) above) using the functional assays described herein.

Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of an anti-CD30 antibody coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resulting modified anti-CD30 antibodies can be screened for binding activity.

Antibodies that Bind to the Same Epitope as Anti-CD30 Antibodies of the Invention

In another embodiment, the invention provides defucosylated antibodies that bind to the same epitope as do the various anti-CD30 antibodies of the invention provided herein, such as other human antibodies that bind to the same epitope as the 5F11, 17G1 or 2H9 antibodies described herein. Such additional antibodies can be identified based on their ability to cross-compete (*e.g.*, to competitively inhibit the binding of, in a statistically significant manner) with other antibodies of the invention, such as 5F11, 17G1 or 2H9, in standard CD30 binding assays. The ability of a test antibody to inhibit the binding of, *e.g.*, 5F11, 17G1 or 2H9 to human CD30 demonstrates that the test antibody can compete with that antibody for binding to human CD30; such an antibody may, according to non-limiting theory, bind to the same or a related (*e.g.*, a structurally similar or spatially proximal) epitope on human CD30 as the antibody with which it competes. In a preferred embodiment, the defucosylated antibody that binds to the same epitope on human CD30 as 5F11, 17G1 or 2H9 is a human monoclonal antibody. Such human monoclonal antibodies can be prepared and isolated as described in PCT Publication WO 03/059282.

Engineered and Modified Antibodies

A defucosylated antibody of the invention further can be prepared using an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences disclosed herein as starting material to engineer a modified antibody, which modified antibody may have altered properties from the starting antibody. An antibody can be engineered by modifying one or more amino acid residues within one or both variable regions (*i.e.*,

V_H and/or V_L), for example within one or more CDR regions and/or within one or more framework regions. Additionally or alternatively, an antibody can be engineered by modifying residues within the constant region(s), for example to alter the effector function(s) of the antibody.

One type of variable region engineering that can be performed is CDR grafting. Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain complementarity determining regions (CDRs). For this reason, the amino acid sequences within CDRs are more diverse between individual antibodies than sequences outside of CDRs. Because CDR sequences are responsible for most antibody-antigen interactions, it is possible to express recombinant antibodies that mimic the properties of specific naturally occurring antibodies by constructing expression vectors that include CDR sequences from the specific naturally occurring antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (see, *e.g.*, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. See. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*).

Accordingly, another embodiment of the invention pertains to a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7, 8, and 9, SEQ ID NOs: 10, 11, and 12, and SEQ ID NOs: 13, 14, and 15, respectively, and a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 16, 17, and 18, SEQ ID NOs: 19, 20, and 21 and SEQ ID NOs: 22, 23, and 24, respectively. Thus, such antibodies contain the V_H and V_L CDR sequences of monoclonal antibodies 5F11, 17G1, or 2H9 yet may contain different framework sequences from these antibodies.

Such framework sequences can be obtained from public DNA databases or published references that include germline antibody gene sequences. For example, germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be found in the "VBase" human germline sequence database (available on the Internet at www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), as well as in Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and

Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference.

Preferred framework sequences for use in the antibodies of the invention are those that are structurally similar to the framework sequences used by selected antibodies of the invention, *e.g.*, similar to the V_H 4-34 or 3-07 sequences (SEQ ID NO: 25 or 26) and/or the V_k L15, A27 or L6 framework sequence (SEQ ID NO: 27, 28, or 29) used by preferred monoclonal antibodies of the invention. The V_H CDR1, 2 and 3 sequences, and the V_K CDR1, 2 and 3 sequences, can be grafted onto framework regions that have the identical sequence as that found in the germline immunoglobulin gene from which the framework sequence derive, or the CDR sequences can be grafted onto framework regions that contain one or more mutations as compared to the germline sequences. For example, it has been found that in certain instances it is beneficial to mutate residues within the framework regions to maintain or enhance the antigen binding ability of the antibody (see *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al*).

Another type of variable region modification is to mutate amino acid residues within the V_H and/or V_K CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions to thereby improve one or more binding properties (*e.g.*, affinity) of the antibody of interest. Site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis can be performed to introduce the mutation(s) and the effect on antibody binding, or other functional property of interest, can be evaluated in *in vitro* or *in vivo* assays as described herein and provided in the Examples. Preferably conservative modifications (as discussed above) are introduced. The mutations may be amino acid substitutions, additions or deletions, but are preferably substitutions. Moreover, typically no more than one, two, three, four or five residues within a CDR region are altered.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides defucosylated anti-CD30 monoclonal antibodies, or antigen binding portions thereof, comprising a heavy chain variable region comprising: (a) a V_H CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 7, 8, and 9, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions,

deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 7, 8, and 9; (b) a V_H CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, 11, and 12, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, 11, and 12; (c) a V_H CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 13, 14, and 15, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 13, 14, and 15; (d) a V_K CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 16, 17 and 18, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 16, 17, and 18; (e) a V_K CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 19, 20, and 21, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 19, 20, and 21; and (f) a V_K CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 22, 23, and 24, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 22, 23, and 24.

Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within V_H and/or V_K, *e.g.* to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation may contain framework residues that differ from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived. For example, for 5F11, amino acid residue #83 (within FR3) of V_H is an asparagine whereas this residue in the corresponding V_H 4-34 germline sequence is a serine. To

return the framework region sequences to their germline configuration, the somatic mutations can be "backmutated" to the germline sequence by, for example, site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis (*e.g.*, residue 83 of FR3 of the V_H of 5F11 can be "backmutated" from asparagine to serine. Such "backmutated" antibodies are also intended to be encompassed by the invention.

Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in futher detail in U.S. Patent Publication No. 20030153043 by Carr *et al.*

In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the invention may be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the invention may be chemically modified (*e.g.*, one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these embodiments is described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

In one embodiment, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, *e.g.*, increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425 by Bodmer *et al.* The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

In another embodiment, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired Staphylococcyl protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745 by Ward *et al.*

In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following

mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375 to Ward. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022 by Presta *et al.*

In yet other embodiments, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260, both by Winter *et al.*

In another example, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 6,194,551 by Idusogie *et al.*

In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351 by Bodmer *et al.*

In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This approach is described further in PCT Publication WO 00/42072 by Presta. Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγR1, FcγRII, FcγRIII and FcRn have been mapped and variants with improved

binding have been described (see Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to FcγRIII. Additionally, the following combination mutants were shown to improve FcγRIII binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

Another modification of the antibodies herein that is contemplated by the invention is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (*e.g.*, serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Preferably, the pegylation is carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the invention. See for example, EP 0 154 316 by Nishimura *et al.* and EP 0 401 384 by Ishikawa *et al.*

Methods of Engineering Antibodies

As discussed above, the defucosylated anti-CD30 antibodies having V_H and V_K sequences disclosed herein can be used to create new anti-CD30 antibodies by modifying the VH and/or V_K sequences, or the constant region(s) attached thereto. Thus, in another aspect of the invention, the structural features of an anti-CD30 antibody of the invention, *e.g.* 5F11, 17G1, or 2H9, are used to create structurally related defucosylated anti-CD30 antibodies that retain at least one functional property of the antibodies of the invention, such as binding to human CD30. For example, one or more CDR regions of 5F11, 17G1, or 2H9, or mutations thereof, can be combined recombinantly with known framework regions and/or other CDRs to create additional, recombinantly-engineered, anti-CD30 antibodies of the invention, as discussed above.

Other types of modifications include those described in the previous section. The starting material for the engineering method is one or more of the V_H and/or V_K sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. To create the engineered antibody, it is not necessary to actually prepare (*i.e.*, express as a protein) an antibody having one or more of the V_H and/or V_K sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. Rather, the information contained in the sequence(s) is used as the starting material to create a "second generation" sequence(s) derived from the original sequence(s) and then the "second generation" sequence(s) is prepared and expressed as a protein.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides a method for preparing an anti-CD30 antibody comprising:

(a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7, 8, and 9, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 11, and 12 and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13, 14, and 15; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 16, 17, and 18, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 20, and 21 and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 22, 23, and 24;

(b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and

(c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

Standard molecular biology techniques can be used to prepare and express the altered antibody sequence. The altered antibody sequence so prepared can then be made in defucosylated form using the methods disclosed herein to obtain a defucosylated altered anti-CD30 antibody.

The functional properties of the altered antibodies can be assessed using standard assays available in the art and/or described herein, such as those set forth in the Examples (*e.g.*, flow cytometry, binding assays, ADCC assays).

In certain embodiments of the methods of engineering antibodies of the invention, mutations can be introduced randomly or selectively along all or part of an anti-CD30 antibody coding sequence and the resulting modified anti-CD30 antibodies

can be screened for binding activity and/or other functional properties as described herein. Mutational methods have been described in the art. For example, PCT Publication WO 02/092780 by Short describes methods for creating and screening antibody mutations using saturation mutagenesis, synthetic ligation assembly, or a combination thereof. Alternatively, PCT Publication WO 03/074679 by Lazar *et al.* describes methods of using computational screening methods to optimize physiochemical properties of antibodies.

Nucleic Acid Molecules Encoding Antibodies of the Invention

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules that encode the antibodies of the invention. The term "nucleic acid molecule", as used herein, is intended to include DNA molecules and RNA molecules. A nucleic acid molecule may be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when purified away from other cellular components or other contaminants, *e.g.*, other cellular nucleic acids or proteins, by standard techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel electrophoresis and others well known in the art. *See*, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of the invention can be, for example, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. In a preferred embodiment, the nucleic acid is a cDNA molecule.

Nucleic acids of the invention can be obtained using standard molecular biology techniques. For antibodies expressed by hybridomas (*e.g.*, hybridomas prepared from transgenic mice carrying human immunoglobulin genes as described further below), cDNAs encoding the light and heavy chains of the antibody made by the hybridoma can be obtained by standard PCR amplification or cDNA cloning techniques. For antibodies obtained from an immunoglobulin gene library (*e.g.*, using phage display techniques), nucleic acid encoding the antibody can be recovered from the library.

Preferred nucleic acids molecules of the invention are those encoding the VH and VL sequences of the 5F11, 17G1, and 2H9 monoclonal antibodies. The DNA

sequence encoding the VH sequence of 5F11 is shown in SEQ ID NO: 30. The DNA sequence encoding the VL sequence of 5F11 is shown in SEQ ID NO: 33. The DNA sequence encoding the VH sequence of 17G1 is shown in SEQ ID NO: 31. The DNA sequence encoding the VL sequence of 17G1 is shown in SEQ ID NO: 34. The DNA sequence encoding the VH sequence of 2H9 is shown in SEQ ID NO: 32. The DNA sequence encoding the VL sequence of 2H9 is shown in SEQ ID NO: 35.

Once DNA fragments encoding VH and VL segments are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes or to a scFv gene. In these manipulations, a VL- or VH-encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

The isolated DNA encoding the VH region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the VH-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., el al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG4 constant region. For a Fab fragment heavy chain gene, the VH-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

The isolated DNA encoding the VL region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the VL-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by

standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region, but most preferably is a kappa constant region.

To create a scFv gene, the VH- and VL-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, *e.g.*, encoding the amino acid sequence $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, such that the VH and VL sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the VL and VH regions joined by the flexible linker (see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

The nucleic acid compositions of the present invention, while often in a native sequence (except for modified restriction sites and the like), from either cDNA, genomic or mixtures may be mutated, thereof in accordance with standard techniques to provide gene sequences. For coding sequences, these mutations, may affect amino acid sequence as desired. In particular, DNA sequences substantially homologous to or derived from native V, D, J, constant, switches and other such sequences described herein are contemplated (where "derived" indicates that a sequence is identical or modified from another sequence).

Production of Monoclonal Antibodies of the Invention

Monoclonal antibodies (mAbs) of the present invention can be produced by a variety of techniques, including conventional monoclonal antibody methodology *e.g.*, the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Although somatic cell hybridization procedures are preferred, in principle, other techniques for producing monoclonal antibody can be employed *e.g.*, viral or oncogenic transformation of B lymphocytes.

The preferred animal system for preparing hybridomas is the murine system. Hybridoma production in the mouse is a very well-established procedure. Immunization protocols and techniques for isolation of immunized splenocytes for fusion are known in the art. Fusion partners (*e.g.*, murine myeloma cells) and fusion procedures are also known.

In various embodiments, the antibody can be, for example, human antibodies, humanized antibodies or chimeric antibodies.

Chimeric or humanized antibodies of the present invention can be prepared based on the sequence of a murine monoclonal antibody prepared as described above. DNA encoding the heavy and light chain immunoglobulins can be obtained from the murine hybridoma of interest and engineered to contain non-murine (*e.g.*,. human) immunoglobulin sequences using standard molecular biology techniques. For example, to create a chimeric antibody, the murine variable regions can be linked to human constant regions using methods known in the art (see *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly *et al.*). To create a humanized antibody, the murine CDR regions can be inserted into a human framework using methods known in the art (see *e.g.*, U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*). A variety of mouse anti-CD30 antibodies are known in the art that can be used to create chimeric or humanized anti-CD30 antibodies, for example, AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, and Ber-H8.

In a preferred embodiment, the antibodies of the invention are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against CD30 can be generated using transgenic or transchromosomic mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse system. These transgenic and transchromosomic mice include mice referred to herein as HuMAb mice and KM mice, respectively, and are collectively referred to herein as "human Ig mice."

The HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see *e.g.*, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ, and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgGκ monoclonal (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). The preparation and use of HuMab mice, and the genomic modifications carried by such mice, is further described in Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International*

Immunology 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; and Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, the contents of all of which are hereby specifically incorporated by reference in their entirety. See further, U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay; U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.*; PCT Publication Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962, all to Lonberg and Kay; and PCT Publication No. WO 01/14424 to Korman *et al.*

In another embodiment, human antibodies of the invention can be raised using a mouse that carries human immunoglobulin sequences on transgenes and transchomosomes, such as a mouse that carries a human heavy chain transgene and a human light chain transchromosome. Such mice, referred to herein as "KM mice", are described in detail in PCT Publication WO 02/43478 to Ishida *et al.*

Still further, alternative transgenic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-CD30 antibodies of the invention. For example, an alternative transgenic system referred to as the Xenomouse (Abgenix, Inc.) can be used; such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 and 6,162,963 to Kucherlapati *et al.*

Moreover, alternative transchromosomic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-CD30 antibodies of the invention. For example, mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain tranchromosome, referred to as "TC mice" can be used; such mice are described in Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Furthermore, cows carrying human heavy and light chain transchromosomes have been described in the art (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) and can be used to raise anti-CD30 antibodies of the invention.

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using phage display methods for screening libraries of human immunoglobulin genes. Such phage display methods for isolating human antibodies are established in the art. See

for example: U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty *et al.*; and U.S. Patent Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths *et al.*

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using SCID mice into which human immune cells have been reconstituted such that a human antibody response can be generated upon immunization. Such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,476,996 and 5,698,767 to Wilson *et al.*

Immunization of Human Ig Mice

When human Ig mice are used to raise human antibodies of the invention, such mice can be immunized with a purified or enriched preparation of CD30 antigen and/or recombinant CD30, or an CD30 fusion protein, as described by Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; and PCT Publication WO 98/24884 and WO 01/14424. Preferably, the mice will be 6-16 weeks of age upon the first infusion. For example, a purified or recombinant preparation (5-50 μg) of CD30 antigen can be used to immunize the human Ig mice intraperitoneally.

Detailed procedures to generate fully human monoclonal antibodies to CD30 are described in PCT Publication WO 03/059282. Cumulative experience with various antigens has shown that the transgenic mice respond when initially immunized intraperitoneally (IP) with antigen in complete Freund's adjuvant, followed by every other week IP immunizations (up to a total of 6) with antigen in incomplete Freund's adjuvant. However, adjuvants other than Freund's are also found to be effective. In addition, whole cells in the absence of adjuvant are found to be highly immunogenic. The immune response can be monitored over the course of the immunization protocol with plasma samples being obtained by retroorbital bleeds. The plasma can be screened by ELISA (as described below), and mice with sufficient titers of anti-CD30 human immunoglobulin can be used for fusions. Mice can be boosted intravenously with antigen 3 days before sacrifice and removal of the spleen. It is expected that 2-3 fusions for each immunization may need to be performed. Between 6 and 24 mice are typically immunized for each antigen. Usually both HCo7 and HCo12 strains are used. In addition, both HCo7 and HCo12 transgene can be bred

together into a single mouse having two different human heavy chain transgenes (HCo7/HCo12).

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies of the Invention

To generate hybridomas producing human monoclonal antibodies of the invention, splenocytes and/or lymph node cells from immunized mice can be isolated and fused to an appropriate immortalized cell line, such as a mouse myeloma cell line. The resulting hybridomas can be screened for the production of antigen-specific antibodies. For example, single cell suspensions of splenic lymphocytes from immunized mice can be fused to one-sixth the number of P3X63-Ag8.653 nonsecreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL 1580) with 50% PEG. Cells are plated at approximately 2 x 10^5 in flat bottom microtiter plate, followed by a two week incubation in selective medium containing 20% fetal Clone Serum, 18% "653" conditioned media, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamycin and 1X HAT (Sigma; the HAT is added 24 hours after the fusion). After approximately two weeks, cells can be cultured in medium in which the HAT is replaced with HT. Individual wells can then be screened by ELISA for human monoclonal IgM and IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth occurs, medium can be observed usually after 10-14 days. The antibody secreting hybridomas can be replated, screened again, and if still positive for human IgG, the monoclonal antibodies can be subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones can then be cultured *in vitro* to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for characterization.

To purify human monoclonal antibodies, selected hybridomas can be grown in two-liter spinner-flasks for monoclonal antibody purification. Supernatants can be filtered and concentrated before affinity chromatography with protein A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Eluted IgG can be checked by gel electrophoresis and high performance liquid chromatography to ensure purity. The buffer solution can be exchanged into PBS, and the concentration can be determined by OD280 using 1.43 extinction coefficient. The monoclonal antibodies can be aliquoted and stored at -80° C.

Generation of Transfectomas Producing Monoclonal Antibodies of the Invention

Antibodies of the invention also can be produced in a host cell transfectoma using, for example, a combination of well known recombinant DNA techniques and gene transfection methods (*e.g.*, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

For example, to express the antibodies, or antibody fragments thereof, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, can be obtained by standard molecular biology techniques (*e.g.*, PCR amplification or cDNA cloning using a hybridoma that expresses the antibody of interest) and the DNAs can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (*e.g.*, ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). The light and heavy chain variable regions of the antibodies described herein can be used to create full-length antibody genes of any antibody isotype by inserting them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions of the desired isotype such that the V_H segment is operatively linked to the C_H segment(s) within the vector and the V_K segment is operatively linked to the C_L segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, *etc.* Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP) and polyoma. Alternatively, nonviral regulatory sequences may be used, such as the ubiquitin promoter or β-globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SRα promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr- host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard

techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and most preferably mammalian host cells, is the most preferred because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. Prokaryotic expression of antibody genes has been reported to be ineffective for production of high yields of active antibody (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Preferred host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include cells which modify the fucosylation of an expressed antibody. For example, the host cell may be a cell that is lacking in a fucosyltransferase enzyme such that the host cell produces proteins lacking fucose in their carbohydrates, or a host cell that expresses glycoprotein-modifying glycosyl transferases such that expressed antibodies in the host cell have increased bisecting GlcNac structures that prevents fucosylation. Other mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr- CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), NS0 myeloma cells, COS cells and SP2 cells. In particular, for use with NS0 myeloma cells, another preferred expression system is the GS gene expression system disclosed in WO 87/04462, WO 89/01036 and EP 338,841. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

69

Immunoconjugates

In another aspect, the present invention features a defucosylated anti-CD30 antibody, or a fragment thereof, conjugated to a therapeutic moiety, such as a cytotoxin, a drug (*e.g.*, an immunosuppressant) or a radiotoxin. Such conjugates are referred to herein as "immunoconjugates". Immunoconjugates that include one or more cytotoxins are referred to as "immunotoxins." A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to (*e.g.*, kills) cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents also include, for example, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine and vinblastine).

Other preferred examples of therapeutic cytotoxins that can be conjugated to an antibody of the invention include duocarmycins, calicheamicins, maytansines and auristatins, and derivatives thereof. An example of a calicheamicin antibody conjugate is commercially available (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Cytoxins can be conjugated to antibodies of the invention using linker technology available in the art. Examples of linker types that have been used to conjugate a cytotoxin to an antibody include, but are not limited to, hydrazones, thioethers, esters, disulfides and peptide-containing linkers. A linker can be chosen that is, for example, susceptible to cleavage by low pH within the lysosomal compartment or susceptible to cleavage by proteases, such as proteases preferentially expressed in tumor tissue such as cathepsins (*e.g.*, cathepsins B, C, D).

For further discussion of types of cytotoxins, linkers and methods for conjugating therapeutic agents to antibodies, see also Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug*

Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Antibodies of the present invention also can be conjugated to a radioactive isotope to generate cytotoxic radiopharmaceuticals, also referred to as radioimmunoconjugates. Examples of radioactive isotopes that can be conjugated to antibodies for use diagnostically or therapeutically include, but are not limited to, iodine^{131}, indium^{111}, yttrium^{90} and lutetium^{177}. Method for preparing radioimmunconjugates are established in the art. Examples of radioimmunoconjugates are commercially available, including Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) and Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), and similar methods can be used to prepare radioimmunoconjugates using the antibodies of the invention.

The antibody conjugates of the invention can be used to modify a given biological response, and the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, an enzymatically active toxin, or active fragment thereof, such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor or interferon-γ; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, *e.g.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer

Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Pharmaceutical Compositions

In another aspect, the present invention provides a composition, *e.g.*, a pharmaceutical composition, containing one or a combination of monoclonal antibodies, or antigen-binding portion(s) thereof, of the present invention, formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. Such compositions may include one or a combination of (*e.g.*, two or more different) antibodies, or immunoconjugates of the invention. For example, a pharmaceutical composition of the invention can comprise a combination of antibodies (or immunoconjugates) that bind to different epitopes on the target antigen or that have complementary activities.

Pharmaceutical compositions of the invention also can be administered in combination therapy, *i.e.*, combined with other agents. For example, the combination therapy can include a defucosylated anti-CD30 antibody of the present invention combined with at least one other anti-neoplastic, anti-inflammatory or immunosuppressive agent. Such therapeutic agents include, among others, steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS), *e.g.*, aspirin and other salicylates, such as ibuprofen (Motrin, Advil), naproxen (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenac (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofen (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetone (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozin (Daypro), indomethacin (Indocin), and aspirin in high doses. Other examples of therapeutic agents that can be used in combination therapy are described in greater detail below in the section on uses of the antibodies of the invention.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Preferably, the carrier is suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (*e.g.*, by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, *i.e.*, antibody or

immunoconjuage, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

The pharmaceutical compounds of the invention may include one or more pharmaceutically acceptable salts. A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound and does not impart any undesired toxicological effects (see *e.g.*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium, magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines, such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

A pharmaceutical composition of the invention also may include a pharmaceutically acceptable anti-oxidant. Examples of pharmaceutically acceptable antioxidants include: (1) water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; (2) oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and (3) metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers that may be employed in the pharmaceutical compositions of the invention include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Prevention of presence of microorganisms may be ensured both by sterilization procedures, *supra*, and by the

inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the pharmaceutical compositions of the invention is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) that yield a powder of the active

ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated, and the particular mode of administration. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred per cent, this amount will range from about 0.01 per cent to about ninety-nine percent of active ingredient, preferably from about 0.1 per cent to about 70 per cent, most preferably from about 1 per cent to about 30 per cent of active ingredient in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

For administration of the antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 0.3 mg/kg body weight, 1 mg/kg body weight, 3 mg/kg body weight, 5 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per week, once every two weeks, once every three weeks, once every four weeks, once a month, once every 3 months or once every three to 6 months. Preferred dosage regimens for a defucosylated anti-CD30 antibody of the invention include 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight via intravenous administration, with the antibody being given

using one of the following dosing schedules: (i) every four weeks for six dosages, then every three months; (ii) every three weeks; (iii) 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks.

In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated. Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be, for example, weekly, monthly, every three monthgs or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of antibody to the target antigen in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of about 1-1000 μg /ml and in some methods about 25-300 μg /ml.

Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, human antibodies show the longest half life, followed by humanized antibodies, chimeric antibodies, and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present invention may be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level will depend upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in

combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

A "therapeutically effective dosage" of an anti-CD30 antibody of the invention preferably results in a decrease in severity of disease symptoms, an increase in frequency and duration of disease symptom-free periods, or a prevention of impairment or disability due to the disease affliction. For example, for the treatment of cancerous tumors, a "therapeutically effective dosage" preferably inhibits cell growth or tumor growth by at least about 20%, more preferably by at least about 40%, even more preferably by at least about 60%, and still more preferably by at least about 80% relative to untreated subjects. The ability of a compound to inhibit tumor growth can be evaluated in an animal model system predictive of efficacy in human tumors. Alternatively, this property of a composition can be evaluated by examining the ability of the compound to inhibit, such inhibition *in vitro* by assays known to the skilled practitioner. A therapeutically effective amount of a therapeutic compound can decrease tumor size, or otherwise ameliorate symptoms in a subject. One of ordinary skill in the art would be able to determine such amounts based on such factors as the subject's size, the severity of the subject's symptoms, and the particular composition or route of administration selected.

A composition of the present invention can be administered via one or more routes of administration using one or more of a variety of methods known in the art. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. Preferred routes of administration for antibodies of the invention include intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, spinal or other parenteral routes of administration, for example by injection or infusion. The phrase "parenteral administration" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

Alternatively, a defucosylated antibody of the invention can be administered via a non-parenteral route, such as a topical, epidermal or mucosal route of

administration, for example, intranasally, orally, vaginally, rectally, sublingually or topically.

The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. *See, e.g.,* Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Therapeutic compositions can be administered with medical devices known in the art. For example, in a preferred embodiment, a therapeutic composition of the invention can be administered with a needleless hypodermic injection device, such as the devices disclosed in U.S. Patent Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; or 4,596,556. Examples of well-known implants and modules useful in the present invention include: U.S. Patent No. 4,487,603, which discloses an implantable micro-infusion pump for dispensing medication at a controlled rate; U.S. Patent No. 4,486,194, which discloses a therapeutic device for administering medicants through the skin; U.S. Patent No. 4,447,233, which discloses a medication infusion pump for delivering medication at a precise infusion rate; U.S. Patent No. 4,447,224, which discloses a variable flow implantable infusion apparatus for continuous drug delivery; U.S. Patent No. 4,439,196, which discloses an osmotic drug delivery system having multi-chamber compartments; and U.S. Patent No. 4,475,196, which discloses an osmotic drug delivery system. These patents are incorporated herein by reference. Many other such implants, delivery systems, and modules are known to those skilled in the art.

In certain embodiments, the defucosylated antibodies of the invention can be formulated to ensure proper distribution *in vivo*. For example, the blood-brain barrier (BBB) excludes many highly hydrophilic compounds. To ensure that the therapeutic compounds of the invention cross the BBB (if desired), they can be formulated, for example, in liposomes. For methods of manufacturing liposomes, see, *e.g.*, U.S. Patents 4,522,811; 5,374,548; and 5,399,331. The liposomes may comprise one or more moieties which are selectively transported into specific cells or organs, thus enhance targeted drug delivery (*see, e.g.*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.*

29:685). Exemplary targeting moieties include folate or biotin (see, *e.g.*, U.S. Patent 5,416,016 to Low *et al.*); mannosides (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); antibodies (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); surfactant protein A receptor (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); see also K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Uses and Methods of the Invention

The defucosylated antibodies, antibody compositions and methods of the present invention have numerous *in vitro* and *in vivo* diagnostic and therapeutic utilities involving the diagnosis and treatment of disorders involving CD30 expression. For example, these molecules can be administered to cells in culture, *e.g. in vitro* or *ex vivo*, or to human subjects, *e.g.*, *in vivo*, to treat, prevent and to diagnose a variety of disorders. As used herein, the term "subject" is intended to include human and non-human animals. Non-human animals includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows, horses, pigs, chickens, avians, amphibians, and reptiles. Preferred subjects include human patients having disorders characterized by CD30 expression. When antibodies to CD30 are administered together with another agent, the two can be administered in either order or simultaneously.

Suitable routes of administering the antibody compositions (*e.g.*, antibody or immunoconjugate) of the invention *in vivo* and *in vitro* are well known in the art and can be selected by those of ordinary skill. For example, the antibody compositions can be administered by injection (*e.g.*, intravenous or subcutaneous). Suitable dosages of the molecules used will depend on the age and weight of the subject and the concentration and/or formulation of the antibody composition.

In one embodiment, the antibodies of the invention can be initially tested for binding activity associated with therapeutic or diagnostic use *in vitro*. For example, compositions of the invention can be tested using ELISA and flow cytometric assays. Moreover, the activity of these molecules in triggering at least one effector-mediated effector cell activity, including inhibiting the growth of and/or killing of cells

expressing CD30 can be assayed. Protocols for assaying for effector cell-mediated ADCC are described in the Examples below.

A. Detection Methods

In one embodiment, the antibodies of the invention can be used to detect levels of CD30, or levels of cells which contain CD30 on their membrane surface, which levels can then be linked to certain disease symptoms.

In a particular embodiment, the invention provides methods for detecting the presence of CD30 antigen in a sample, or measuring the amount of CD30 antigen, comprising contacting the sample, and a control sample, with a defucosylated antibody, or an antigen binding portion thereof, which specifically binds to CD30, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and CD30. The formation of a complex is then detected, wherein a difference complex formation between the sample compared to the control sample is indicative the presence of CD30 antigen in the sample. For example, standard detection methods, well-known in the art, such as ELISA and flow cytometic assays, can be performed using the compositions of the invention.

Accordingly, in one aspect, the invention further provides methods for detecting the presence of CD30 (*e.g.*, human CD30 antigen) in a sample, or measuring the amount of CD30, comprising contacting the sample, and a control sample, with an antibody of the invention, or an antigen binding portion thereof, which specifically binds to CD30, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and CD30. The formation of a complex is then detected, wherein a difference in complex formation between the sample compared to the control sample is indicative of the presence of CD30 in the sample.

The compositions of the invention can also be used to target cells expressing CD30, for example for labeling such cells. For such use, the binding agent can be linked to a molecule that can be detected. Thus, the invention provides methods for localizing *ex vivo* or *in vitro* cells expressing CD30. The detectable label can be, *e.g.*, a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor.

B. Inhibition of Growth of CD30+ Cells

The antibodies can be used to inhibit or block CD30 function which, in turn, can be linked to the prevention or amelioration of certain disease symptoms, thereby

implicating CD30 as being involved in the disease. Differences in CD30 expression during a disease state as compared to a non-disease state can be determined by contacting a test sample from a subject suffering from the disease and a control sample with the anti-CD30 antibody under conditions that allow for the formation of a complex between the antibody and CD30. Any complexes formed between the antibody and CD30 are detected and compared in the sample and the control.

For example, the antibodies can be used to elicit *in vivo* or *in vitro* one or more of the following biological activities: to inhibit the growth of and/or kill a cell expressing CD30; to mediate phagocytosis or ADCC of a cell expressing CD30 in the presence of human effector cells; to inhibit shedding of soluble CD30, to block CD30 ligand binding to CD30, to inhibit IL-4 expression or to mediate expression of the Th2 phenotype, *e.g.*, at low dosages. As discussed herein, the defucosylated antibodies of the invention exhibit enhanced ADCC activity as compared to the fucosylated form of the antibody.

Accordingly, in another aspect, the invention provides a method of inhibiting growth of $CD30^+$ cells comprising contacting said cells with a defucosylated anti-CD30 antibody under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) of said cells. The cells can be, for example, tumor cells. In a preferred embodiment, the anti-CD30 antibody is a human antibody.

In one embodiment, the antibodies, or binding portions thereof, of the present invention can be used to modulate CD30 levels on target cells, such as by capping and eliminating receptors on the cell surface. Mixtures of anti-Fc receptor antibodies can also be used for this purpose.

Target-specific effector cells, *e.g.*, effector cells linked to compositions of the invention can also be used as therapeutic agents. Effector cells for targeting can be human leukocytes such as macrophages, neutrophils or monocytes. Other cells include eosinophils, natural killer cells and other IgG- or IgA-receptor bearing cells. If desired, effector cells can be obtained from the subject to be treated. The target-specific effector cells, can be administered as a suspension of cells in a physiologically acceptable solution. The number of cells administered can be in the order of 10^8-10^9 but will vary depending on the therapeutic purpose. In general, the amount will be sufficient to obtain localization at the target cell, *e.g.*, a tumor cell

expressing CD30, and to effect cell killing by, *e.g.*, phagocytosis. Routes of administration can also vary.

Therapy with target-specific effector cells can be performed in conjunction with other techniques for removal of targeted cells. For example, anti-tumor therapy using the compositions of the invention and/or effector cells armed with these compositions can be used in conjunction with chemotherapy. Additionally, combination immunotherapy may be used to direct two distinct cytotoxic effector populations toward tumor cell rejection.

C. Use of Immunoconjugates and Combination Therapy

In one embodiment, immunoconjugates of the invention can be used to target compounds (*e.g.*, therapeutic agents, labels, cytotoxins, radiotoxins immunosuppressants, etc.) to cells which have CD30 cell surface receptors by linking such compounds to the antibody. Thus, the invention also provides methods for localizing *ex vivo* or *in vitro* cells expressing CD30 (*e.g.*, with a detectable label, such as a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor). Alternatively, the immunoconjugates can be used to kill cells which have CD30 cell surface receptors by targeting cytotoxins or radiotoxins to CD30, such as to CD30-expressing tumor cells to thereby eliminate the tumor cell, or to CD30-expressing antigen-presenting cells to thereby eliminate the APCs as a means to inhibit immune responses (*e.g.*, in autoimmune disorders).

In other embodiments, the subject can be additionally treated with an agent that modulates, *e.g.*, enhances or inhibits, the expression or activity of Fcγ or Fcγ receptors by, for example, treating the subject with a cytokine. Preferred cytokines for administration during treatment include of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte- macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon-γ (IFN-γ), and tumor necrosis factor (TNF).

In another embodiment, the subject can be additionally treated with a lymphokine preparation. Cancer cells which do not highly express CD30 can be induced to do so using lymphokine preparations. Lymphokine preparations can cause a more homogeneous expression of CD30 among cells of a tumor which can lead to a more effective therapy. Lymphokine preparations suitable for administration include interferon-gamma, tumor necrosis factor, and combinations thereof. These can be

administered intravenously. Suitable dosages of lymphokine are 10,000 to 1,000,000 units/patient.

In another embodiment, patients treated with antibody compositions of the invention can be additionally administered (prior to, simultaneously with, or following administration of an antibody of the invention) with another therapeutic agent, such as a cytotoxic or radiotoxic agent, which enhances or augments the therapeutic effect of the human antibodies. The antibody can be linked to the agent (as an immunocomplex) or can be administered separate from the agent. In the latter case (separate administration), the antibody can be administered before, after or concurrently with the agent or can be co-administered with other known therapies, e.g., an anti-cancer therapy, e.g., radiation. Such therapeutic agents include, among others, anti-neoplastic agents such as doxorubicin (adriamycin), cisplatin bleomycin sulfate, carmustine, chlorambucil, and cyclophosphamide hydroxyurea which, by themselves, are only effective at levels which are toxic or subtoxic to a patient. Cisplatin is intravenously administered as a 100 mg/ml dose once every four weeks and adriamycin is intravenously administered as a 60-75 mg/ml dose once every 21 days. Co-administration of the anti-CD30 antibodies, or antigen binding fragments thereof, of the present invention with chemotherapeutic agents provides two anti-cancer agents which operate via different mechanisms which yield a cytotoxic effect to human tumor cells. Such co-administration can solve problems due to development of resistance to drugs or a change in the antigenicity of the tumor cells which would render them unreactive with the antibody.

D. Treatment of Autoimmune Diseases

The compositions can be used *in vitro* or *in vivo* to treat diseases mediated by or involving CD30, for example, diseases characterized by expression, typically overexpression, of CD30 such as autoimmune diseases mediated by macrophages, activated neutrophils, dendritic cells or NK cells, such as transplantation rejection, or Graft versus Host Disease (GVHD). Soluble CD30 is regularly shed from the surface of cells expressing CD30 and elevated sCD30 levels have been reported in the serum of patients with a variety of tumorigenic and autoimmune disorders. Accordingly, yet another use for the antibodies of the invention includes the prevention or treatment of diseases involving blocking or inhibiting of shedding of sCD30.

By contacting the antibody with CD30 (*e.g.*, by administering the antibody to a subject), the ability of CD30 to induce such activities is inhibited and, thus, the associated disorder is treated. The antibody composition can be administered alone or along with another therapeutic agent, such as an immunosuppressant which acts in conjunction with or synergistically with the antibody composition to treat or prevent the CD30 mediated disease. Preferred antibodies bind to epitopes which are specific to CD30 and, thus, advantageously inhibit CD30 induced activities, but do not interfere with the activity of structurally related surface antigens. The compositions can be used to treat any diseases mediated by CD30 expressing cells, including, but not limited to, autoimmune hemolytic anemia (AIHA), rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), Systemic Sclerosis, Atopic Dermatitis, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, Wegner's granulomatosis, Omen's syndrome, chronic renal failure, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), inflammatory bowel disease (IBD; including Crohn's Disease, Ulcerative Colitis and Celiac's Disease), insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), acute infectious mononucleosis, HIV, herpes virus associated diseases, multiple sclerosis (MS), hemolytic anemia, thyroiditis, stiff man syndrome, pemphigus vulgaris and myasthenia gravis (MG).

E. Treatment of Cancer

In another embodiment, the present invention provides a method of inhibiting the growth of CD30+ tumor cells (*i.e.*, tumor cells expressing CD30) in a subject, in which a defucosylated anti-CD30 antibody of the invention is administered to the subject such that growth of the CD30+ tumor cells is inhibited. For human subjects, the antibody preferably is a humanized or human antibody. In a preferred embodiment, the tumor cells are Hodgkin's Disease tumor cells. In another preferred embodiment, the tumor cells are anaplastic large-cell lymphomas (ALCL) tumor cells. In other embodiments, the tumor cells may be from a disease selected from the group consisting of non-Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, cutaneous T-cell lymphomas, nodular small cleaved-cell lymphomas, lymphocytic lymphomas, peripheral T-cell lymphomas, Lennert's lymphomas, immunoblastic lymphomas, T-cell leukemia/lymphomas (ATLL), adult T-cell leukemia (T-ALL), entroblastic/centrocytic (cb/cc) follicular lymphomas cancers, diffuse large cell lymphomas of B lineage, angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD)-like T cell lymphoma, adult T-cell lymphoma (ATL), HIV associated body cavity based lymphomas, Embryonal Carcinomas, undifferentiated carcinomas of the rhino-

pharynx (*e.g.*, Schmincke's tumor), Castleman's disease, Kaposi's Sarcoma and other CD30+ T-cell lymphomas and CD30+ B-cell lymphomas.

The method involves administering to a subject an antibody composition of the present invention in an amount effective to treat or prevent the disorder. The antibody composition can be administered alone or along with another therapeutic agent, such as a cytotoxic or a radiotoxic agent which acts in conjunction with or synergistically with the antibody composition to treat or prevent the disease associated with CD30 expression.

Kits

Also within the scope of the invention are kits comprising an antibody of the invention and instructions for use. The kit can further contain one or more additional reagents, such as an immunostimulatory reagent, a cytotoxic agent or a radiotoxic agent, or one or more additional antibodies of the invention (*e.g.*, an antibody having a complementary activity which binds to an epitope in the CD30 antigen distinct from the first antibody). Kits typically include a label indicating the intended use of the contents of the kit. The term label includes any writing, or recorded material supplied on or with the kit, or which otherwise accompanies the kit.

The present invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as further limiting. The contents of all figures and all references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

85

EXAMPLES

Example 1: Preparation and Characterization of Defucosylated Anti-CD30 Monoclonal Antibody

In this example, a fully human anti-CD30 monoclonal antibody was expressed in a cell line lacking a fucosyl transferase enzyme such that the cell line produces proteins lacking fucose in their carbohydrates. The defucosylated antibody was tested against a fucosylated anti-CD30 antibody (expressed in a different cell line that contains the fucosyl transferase enzyme) to determine structural and characteristic differences between the antibodies, using a variety of chemical analysis techniques, including capillary electrophoresis, comparison of amino acid sequence, mass differences by mass spectroscopy and charge variation by capillary isoelectric focusing.

The anti-CD30 fully human monoclonal antibody 5F11 was originally described in PCT Publication WO 03/059282. The amino acid and nucleotide sequences of the 5F11 heavy chain is shown in Figure 1A and the amino acid and nucleotide sequences of the 5F11 light chain are shown in Figure 1B. The 5F11 heavy and light chain variable sequences were subcloned into an expression vector. The 5F11 kappa variable region cDNA, including its signal sequence and an optimal Kozak sequence, was subcloned in frame with the human kappa constant region. The 5F11 heavy chain variable region cDNA, including its signal sequence and an optimal Kozak sequence, was subcloned in frame with the human γ1 heavy constant region. Both light and heavy chain expression were driven by human ubiquitin C promoters (Nenoi, M. et al. *Gene* 175:179, 1996). This expression vector is described in further detail in U.S. Patent Application Serial No. 60/500,803, the contents of which are expressly incorporated herein by reference.

The expression vector was transfected into the $FUT8^{-/-}$ host cell line Ms704 by DNA electroporation. The Ms704 $FUT8^{-/-}$ cell line was created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors, and is more fully described in U.S. Patent Publication 20040110704 by Yamane *et al.* and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22. The Ms704 cells were

adapted to growth in suspension culture in growth medium, EX-CELL™ 325 PF CHO Medium (JRH #14335) supplemented with 100 μM hypoxanthine with 16 μM thymidine (Invitrogen #11067-030) and 6 mM L-glutamine (Invitrogen #25030-081).

The vector DNA to be used for electroporation was ethanol precipitated and resuspended in 10 mM Tris 7.6, 1 mM EDTA. 1, 5, 10, 15 or 20 μg DNA was utilized for twenty electroporations, four electroporations per DNA concentration. The Ms704 cells were prepared for transfection by washing the cells in a sucrose-buffered solution (SBS) and resuspending the cells at 1 X 10^7 cells/ml SBS solution. 400 μl cells were mixed with construct DNA and electroporated utilizing settings at 230 volts, 400 microfaradays capacitance and 13 ohms resistance (BTX Molecular Delivery Systems #600 electro cell manipulator). The cells were removed from the electroporation cuvettes and 20 ml growth medium was added. The cells were plated into a 96 well dish using 200 μl cells per well, approximately 4 X 10^4 cells/well. 2 days after the electroporation, 150 μl of medium was removed from each well and replaced with 150 μl selection medium, growth medium with 400 μg/ml G418 (Invitrogen #10131-035). Every three to seven days, 150 μl of selection medium per well was replaced with fresh selection medium. CHO DG44 host cells (FUT 8 +/+) were electroporated with the identical 5F11 construct using a similar procedure and CHO DG44 transfectants expressing recombinant 5F11 antibody containing fucosylated carbohydrates were established.

The highest producing Ms704 and CHO DG44 clones were expanded and recombinant 5F11 antibody was purified from cell culture supernatants by Protein A affinity chromatography.

Comparative analysis of N-linked oligosaccharides derived from the Ms704 and the CHO DG44 derived anti-CD30 monoclonal antibody samples was done by capillary electrophoresis laser induced fluorescence (cLIF) (Chen and Evangelista (1998) *Electrophoresis* 15:1892). The N-linked oligosaccharides of the purified antibody were released by adding the peptide N-glycanase (Prozyme) and incubating overnight. The protein was ethanol precipitated, and the carbohydrate containing supernatant was transferred to a new tube and dried using a Speedvac. The carbohydrates were resuspended and derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) under mild reductive amination conditions in which desialylation and loss of fucose residues was minimized. The reaction adducts were analyzed by

87

capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence detector (Beckman Coulter) (Ma and Nashabeh (1999) *Anal. Chem.* 71:5185). Differences in the oligosaccharide profile were observed between the antibody obtained from the Ms704 cell line as compared to the CHO DG44 cell line, consistent with an absence of fucose residues in the Ms704 derived anti-CD30 antibodies.

To confirm the absence of fucose residues on the antibody expressed in Ms704 cells, monosaccharide composition analysis was performed. The results are shown below in Table 1:

Table 1: Monosaccharide Analysis

Antibody	Protein Amount (μg)	Monosaccharide	Amount Found (pmol)	mol Sugar/ mol Protein
Anti-CD30 + fucose	29 μg	Fucose	206.0	1.0
		Galactosamine	0.0	0.0
		Glucosamine	847.6	4.4
		Galactose	85.8	0.5
		Mannose	547.0	2.9
Anti-CD30 - fucose	23 μg	Fucose	0.0	0.0
		Galactosamine	0.0	0.0
		Glucosamine	655.2	4.3
		Galactose	89.7	0.6
		Mannose	488.8	3.2

The results of the monosaccharide analysis confirm that the antibody expressed in Ms704 cells lacks fucosyl residues.

Aside from the difference in oligosaccharides shown by capillary electrophoresis and monosaccharide analysis, the Ms704 and CHO DG44 derived anti-CD30 antibody protein samples were essentially identical. Analysis of N-terminal protein sequence revealed an identical N-terminal amino acid sequence. Mass spectroscopy of the light chain of the Ms704 and CHO DG44 derived anti-CD30 antibodies yielded masses of 23,740 and 23,742, respectively, which were within the error of the instrument. The two antibodies were also tested using a standard capillary isoelectric focusing kit assay (Beckman Coulter) and showed that

the two antibody samples had an identical isoelectric point at 8.6. These studies indicate that the protein component of the antibody samples derived from the Ms704 and the CHO DG44 cells are essentially identical with the exception of the defucosylation of the carbohydrate component of the Ms704 derived antibodies.

Example 2: Assessment of ADCC Activity of Defucosylated Anti-CD30 Antibody

The anti-CD30 monoclonal antibody 5F11 is capable of killing CD30+ cells through the recruitment of an effector cell population via antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In this example, defucosylated 5F11 (defuc-5F11) monoclonal antibodies were tested for the ability to kill CD30+ cell lines in the presence of effector cells in a cytotoxicity chromium release assay.

Human effector cells were prepared from whole blood as follows. Human peripheral blood mononuclear cells were purified from heparinized whole blood by standard Ficoll-paque separation. The cells were resuspended in RPMI1640 media containing 10% FBS and 200 U/ml of human IL-2 and incubated overnight at 37°C. The following day, the cells were collected and washed once in culture media and resuspended at 1 x 10^7 cells/ml. Two million target CD30+ cells were incubated with 200 µCi ^{51}Cr in 1 ml total volume for 1 hour at 37° C. The target cells were washed once, resuspended in 1ml of media, and incubated at 37° C for an additional 30 minutes. After the final incubation, the target cells were washed once and brought to a final volume of 1x10^5 cells/ml.

The CD30+ cell lines L540 (human Hodgkin's lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 72), L428 (human Hodgkin's lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 197), L1236 (human Hodgkin's lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 530) and Karpas (human T cell lymphoma; DSMZ Deposit No. ACC 31) cell lines were initially tested for binding to both the fucosylated 5F11 (fuc-5F11) and defuc-5F11 using a standard FACS analysis. Each target cell displayed similar binding profiles through a range of antibody concentrations for both fuc-5F11 and defuc-5F11. The level of CD30 expression, as determined by mean fluorescence intensity, was highest in L540, followed by Karpas, L428, and the lowest CD30 expression was on L1236 cells.

The L540, L428, L1236 and Karpas cells were tested in a modified ^{51}Cr antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) assay as follows. Each target cell line (100 µl of labeled CD30+ cells) was incubated with 50 µl of effector cells and 50 µl of antibody. A target to effector ratio of 1:50 was used throughout the experiments. In all studies, the following negative controls were also run: a) target and effector cells without antibody, b) target cells without effector cells, c) wells containing target and effector cells in the presence of 1% Triton X-100, and d) human IgG1 isotype control. Following a 4 hour incubation at 37° C, the supernatants were collected and counted on a gamma Counter (Cobra II auto-gamma from Packard Instruments) with a reading window of 240-400 keV. The counts per minute were plotted as a function of antibody concentration and the data was analyzed by non-linear regression, sigmoidal dose response (variable slope) using Prism software (San Diego, CA). Cell cytotoxicity curves for the L540, L428, L1236 and Karpas cell lines using varying concentrations of fuc-5F11 and defuc-5F11 are shown in Figures 4-7, respectively.

The percent lysis was determined by the following equation:

% Lysis = (Sample CPM- no antibody CPM)/TritonX CPM-No antibody CPM) X 100

The % Lysis was tested at an antibody concentration of 25 µg/ml and a target to effector cell ratio of 1:50. EC_{50} values also were calculated for each target cell. The results are summarized in Table 2 below.

90

Table 2: Cytotoxic Ability of Defucosylated Anti-CD30 Monoclonal Antibody

Target cell	% Lysis	% Lysis	% Lysis ratio fucose -: fucose +	EC_{50} (μg/ml)	EC_{50} (μg/ml)	EC_{50} ratio fucose+: fucose-
	Fucose +	Fucose -		Fucose +	Fucose -	
L540	42	68	1.61	0.042	0.009	4.7
Karpas	19	50	2.63	0.250	0.032	7.8
L428	20	43	2.15	0.100	0.009	11.1
L1236	4	13	3.25	1.218	0.045	27.1

Defuc-5F11 showed from 1.61 times (for L540 cells) to 3.25 times (for L1236 cells) greater percent cell lysis as compared to the fuc-5F11 antibody. This increased potency of the defuc-5F11 results in measurable cell lysis at antibody concentrations where the fuc-5F11 has no measurable effect. For example, on L1236 cells, which have a low level of expression of CD30, defuc-5F11 at 0.1 μg/ml results in a 10% specific lysis, whereas fuc-5F11 at the same concentration has no measurable effect (see Figure 6). Defuc-5F11 was 4.7 times (for L540 cells) to 27.1 times (for L1236 cells) more potent in ADCC activity than the fuc-5F11 antibody, as measured by ratio of EC_{50} values.

Example 3: Assessment of ADCC Activity of Anti-CD30 Antibody

In this example, anti-CD30 monoclonal antibodies were tested for the ability to kill CD30+ cell lines in the presence of effector cells via antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in a fluorescence cytotoxicity assay. Human effector cells were prepared as described above and the ADCC assay performed as indicated above. As can be seen in Figure 9, when using the defucosylated anti-CD30 antibody there was increased ADCC activity as compared with parental anti-CD30 antibody. In addition, the defucosylated anti-CD30 antibody was more potent than the parental antibody as evidenced by the reduced EC50 as compared to the parental anti-CD30 antibody. The antibody was also more efficacious as evidenced by the fact that the maximum percent lysis was higher for the defucosylated anti-CD30 antibody. With either antibody, the anti-CD16 (3G8) antibody effectively inhibited the ADCC suggesting that this lysis was mediated by CD16.

Example 4: Increased ADCC With Human Effector Cells

ADCC assays were performed as described above. In this experiment, however, mouse effector cells were compared with human effector cells. As can be seen in Figure 10, while there was no increased ADCC comparing parental anti-CD30 antibody with defucosylated antibody when mouse effector cells were used, when human effector cells were examined, there was a notable increase in ADCC with the defucosylated antibody as compared to the parental anti-CD30 antibody.

Example 5: ADCC assay comparing parental and defucosylated antibody using effector cells from cynomolgus monkeys

Whole blood was obtained from cynomolgus monkeys. Red blood cell lysed cynomolgus peripheral blood cells were stimulated with 50 U/ml rIL-2 and cultured in RPMI1640 media containing 10% FBS overnight at 37°C. On the day of the study, cynomolgus cells were resuspended in assay buffer (RPMI1640, 10% FBS, 2.5 mM probenecid) at $1x10^7$ cells/mL. CD30 positive target cells, Karpas 299, were labeled, washed three times with wash buffer (PBS, 2.5mM probenecid, 20mM HEPES), and adjusted to $1x10^5$ cells/mL for 1:50 target to effector cell ratio. The ADCC assay was performed as described above. We compared the activity of parental anti-CD30 antibody to defucosylated antibody using effector cells purified from cynomolgus blood. Modest ADCC activity was seen with the parental antibody (from around 7-10% cell lysis at 10 μg/mL). In contrast, the defucosylated antibody induced significantly higher percent lysis (from around 10-30% cell lysis at 10 μg/mL) and a reduced EC50 (see Figure 11).

Example 6: Scatchard analysis of binding affinity of anti-CD30 monoclonal antibodies to L540 cells, activated human and cynomolgus peripheral blood cells

The binding affinity of the parental and defucosylated anti-CD30 antibodies was determined. We compared the binding affinity of the two antibodies to CD30 positive L540 cells as well as PHA/Con A-activated human or cynomolgus peripheral blood mononuclear cells.

Human or cynomolgus peripheral blood cells were stimulated with 2μg/ml PHA, 10 μg/ml Con A, and 50 U/ml rIL-2 and cultured in RPMI1640 media containing 10% fetal bovine serum (FBS) at $1x10^6$ cells/ml density for 3 days. On the day of the study, the cells were washed and adjusted to $2x10^7$ cells/ml in binding buffer (RPMI1640 +10% FBS). As a control, CD30 positive L540 cells (adjusted to $4\text{-}8x10^6$ cells/ml) were used in these studies since they express high levels of the antigen. The cells were placed on ice until the initiation of the experiment. Millipore glass fiber filter plates (MAFBN0B50) were coated with 1% nonfat dry milk in water and stored a 4°C overnight. The plates were washed three times with 0.2 ml of binding buffer. Fifty microliters of buffer alone was added to the maximum binding wells (total binding). Twenty-five microliters of buffer alone was added to the control wells. Varying concentration of ^{125}I-anti-CD30 antibody was added to all wells in a volume of 25 μl. Varying concentrations of unlabeled antibody at 300-400 fold excess were added in a volume of 25 μl to control wells (non-specific binding) and 25 μl of CD30 positive L540 cells or stimulated human or cynomolgus peripheral blood cells in binding buffer were added to all wells. The plates were incubated for 2 hours at 200 RPM on a shaker at 4°C. At the completion of the incubation the Millipore plates were washed twice with 0.2 ml of cold wash buffer (RPMI1640, 10% FBS, 500 mM NaCl). The filters were removed and counted in a gamma counter. Evaluation of equilibrium binding was performed using single site binding parameters with the Prism software (San Diego, CA).

Using the above Scatchard binding assay, the K_D of the parental CD30 antibody for L540 cells was approximately 1.4 nM while the defucosylated antibody had a K_D of 1.9 nM (Table 3). This indicates that there was little change in affinity with removal of fucose. These studies were repeated using primary cells rather than a cell line. In addition, the affinity on cells which express significantly fewer receptors per cell was tested. Activated human peripheral blood cells were prepared as indicated above and the K_D was found to be1.1 and 2.7 nM for parental and defucosylated anti-CD30 antibody, respectively.

Finally, the binding affinity of the parental and defucosylated antibody for PHA, Con A, and rIL-2 activated cynomolgus peripheral blood mononuclear cells was compared. The K_D was found to be approximately 0.47 nM and 0.83 nM for parental and defucosylated antibody, respectively.

Table 3 Scatchard Analysis

Sample		L540	Human	Cynomolgus
Parental CD30	KD (nM ave)	1.37	1.08	0.47
	Receptors Per Cell (ave)	2496082	45654	72781
Defucosylated CD30	KD (nM ave)	1.93	2.66	0.83
	Receptors Per Cell (ave)	3024600	74258	108824

Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

94

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO:	SEQUENCE	SEQ ID NO:	SEQUENCE
1	VH a.a. 5F11	19	VK CDR2 a.a. 5F11
2	VH a.a. 17G1	20	VK CDR2 a.a. 17G1
3	VH a.a. 2H9	21	VK CDR2 a.a. 2H9
4	VK a.a. 5F11	22	VK CDR3 a.a. 5F11
5	VK a.a. 17G1	23	VK CDR3 a.a. 17G1
6	VK a.a. 2H9	24	VK CDR3 a.a. 2H9
7	VH CDR1 a.a. 5F11		
8	VH CDR1 a.a. 17G1	25	VH 4-34 germline aa
9	VH CDR1 a.a. 2H9	26	VH 3-07 germline aa
10	VH CDR2 a.a. 5F11	27	VK L15 germline aa
11	VH CDR2 a.a. 17G1	28	VK A27 germline aa
12	VH CDR2 a.a. 2H9	29	VK L6 germline aa
13	VH CDR3 a.a. 5F11	30	VH n.t. 5F11
14	VH CDR3 a.a. 17G1	31	VH n.t. 17G1
15	VH CDR3 a.a. 2H9	32	VH n.t. 2H9
16	VK CDR1 a.a. 5F11	33	VK n.t. 5F11
17	VK CDR1 a.a. 17G1	34	VK n.t. 17G1
18	VK CDR1 a.a. 2H9	35	VK n.t. 2H9

We claim:

1. An isolated anti-CD30 antibody, which lacks fucose residues.

2. The antibody of claim 1, wherein said antibody enhances antibody dependent cellular cytotoxicity of cells expressing cell surface CD30.

3. The antibody of claim 2, wherein said antibody, in fucosylated form, does not induce antibody dependent cellular cytoxicity (ADCC) of L1236 cells (DSMZ Deposit No. Acc 530) *in vitro*, but in defucosylated form does induce ADCC of L1236 cells *in vitro*, wherein ADCC is assessed by an ADCC assay at an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target cell to effector cell ratio of 1:50.

4. The antibody of claim 3, which, in fucose lacking form, enhances ADCC of L540 cells (DSMZ Deposit No. ACC 72), L428 cells (DSMZ Deposit No. ACC 197) and Karpas cells (DSMZ deposit No. ACC 31) *in vitro* as compared to the fucosylated form of the antibody, wherein the ADCC is assessed by an ADCC assay at an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target to effector ratio of 1:50.

5. The antibody of claim 1, which is a monoclonal antibody.

6. The antibody of claim 5, which is a humanized or chimeric antibody.

7. The antibody of claim 6, wherein the humanized or chimeric antibody is prepared from a mouse anti-CD30 antibody selected from the group consisting of: AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 and Ber-H8.

8. The antibody of claim 5, which is a human antibody.

9. The antibody of claim 8, wherein the human antibody comprises a human heavy chain variable region and a human light chain variable region, wherein:
(a) the human heavy chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2 and 3; and
(b) the human light chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 5 and 6.

10. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4.

11. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5.

12. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.

13. The antibody of claim 5, comprising:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7, 8, and 9;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 11, and 12;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13, 14, and 15;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 16, 17, and 18;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 20, and 21; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 22, 23, and 24.

14. The antibody of claim 13, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:7;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:10;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:13;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:16;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:19; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:22.

15. The antibody of claim 13, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:8;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:11;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:14;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:17;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:20; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:23.

16. The antibody of claim 13, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:9;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:12;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:15;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:18;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:21; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:24.

17. The antibody of claim 8, which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 4-34 or V_H 3-07 gene.

18. The antibody of claim 8, which comprises a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L15, A27 or L6 gene.

19. The antibody of claim 8, which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 4-34 or V_H 3-07 gene and a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L15, A27 or L6 gene.

20. A host cell comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding an anti-CD30 antibody, wherein said host cell lacks a fucosyltransferase such that the anti-CD30 antibody expressed by said host cell lacks fucose residues.

21. The host cell of claim 20, wherein the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes.

22. The host cell of claim 20, wherein said fucosyltransferase is FUT8.

23. The host cell of claim 20, which is a CHO cell.

24. A method of inhibiting growth of $CD30^+$ cells comprising contacting said cells with a defucosylated anti-CD30 antibody under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) of said cells.

25. The method of claim 24, wherein said cells are tumor cells.

26. The method of claim 24, wherein said anti-CD30 antibody is a human antibody.

27. A method of inhibiting growth of tumor cells expressing CD30 in a subject, comprising administering to the subject a defucosylated anti-CD30 antibody in an amount effective to inhibit growth of tumor cells expressing CD30 in the subject.

28. The method of claim 27, wherein said anti-CD30 antibody is a human antibody.

29. The method of claim 27, wherein said tumor cells are Hodgkin's Disease (HD) tumor cells.

30. The method of claim 27, wherein said tumor cells are anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) tumor cells.

31. The method of claim 27, wherein the tumor cells are of from a disease selected from the group consisting of non-Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, cutaneous T-cell lymphomas, nodular small cleaved-cell lymphomas, lymphocytic lymphomas, peripheral T-cell lymphomas, Lennert's lymphomas, immunoblastic lymphomas, T-cell leukemia/lymphomas (ATLL), adult T-cell leukemia (T-ALL), entroblastic/centrocytic (cb/cc) follicular lymphomas cancers, diffuse large cell lymphomas of B lineage, angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD)-like T cell lymphoma, adult T-cell lymphoma (ATL), HIV associated body cavity based lymphomas, Embryonal Carcinomas, undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx (*e.g.*, Schmincke's tumor), Castleman's disease, Kaposi's Sarcoma, CD30+ T-cell lymphomas and CD30+ B-cell lymphomas.

Anti-CD30 5F11 VH
V-segment: Locus: 4-34
D segment: Locus - 7-27
J segment: JH4b

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

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

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

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


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

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

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

Fig. 1A

Anti-CD30 5F11 VL
V-segment: Locus: L15
J segment: JK5

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

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

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

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

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

            CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   D   S   Y   P   I   T   F   G   Q   G   T   R   L   E   I   K
271   TAT GAT AGT TAC CCT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
                                  ↳JK5
```

Fig. 1B

Anti-CD30 17G1 VH

V-segment: Locus: 3-07
D segment: Not Found
J segment: JH2

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

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

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

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

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

                                        CDR3
                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     T   A   V   Y   Y   C   A   R   V   H   W   Y   F   H   L   W   G   R
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GTT CAT TGG TAC TTC CAT CTC TGG GGC CGT
                                            |
                                            ↳ JH2
     G   T   L   V   T   V   S   S
325  GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA
```

Fig. 2A

Anti-CD30 17G1 VL
V-segment: Locus: A27
J segment: JK1

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

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

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

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

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

                CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q   Y   G   S   S   P   W   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                            └──► JK1
```

Fig. 2B

Anti-2H9 CD30 VH
V-segment: Locus: 4-34
D segment: Locus - 5-12
J segment: JH2

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 3A

Anti-2H9 CD30 VL
V-segment: Locus: L6
J segment: JK1

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

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

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

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

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

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

Fig. 3B

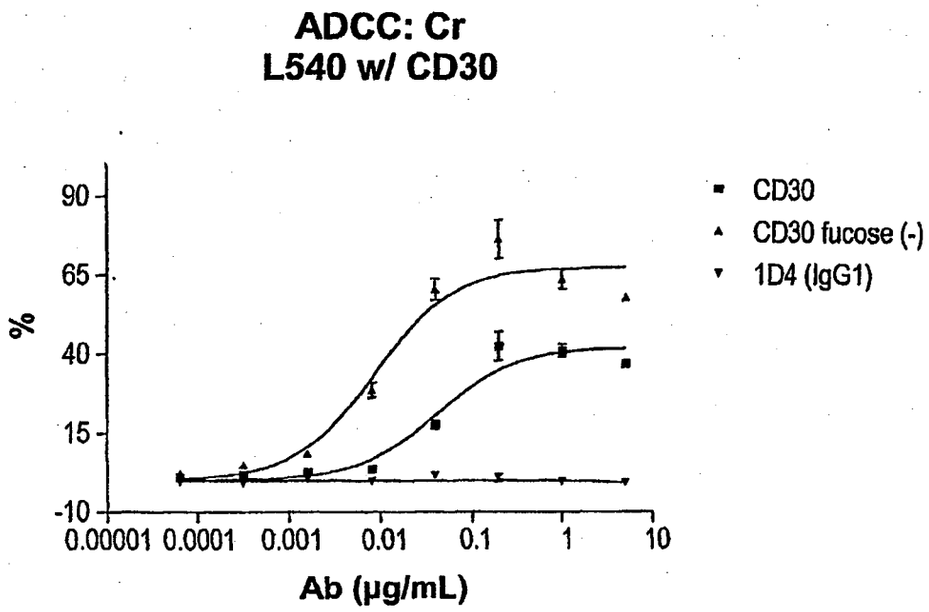

ADCC: Cr
L540 w/ CD30
90
65
40
15
-10
%
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 fucose (-)
1D4 (IgG1)

Fig. 4

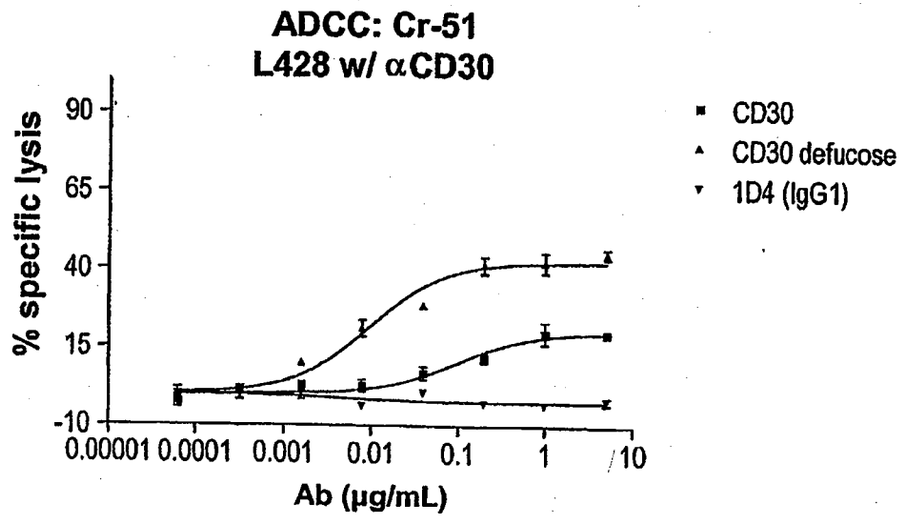

ADCC: Cr-51
L428 w/ αCD30
% specific lysis
90
65
40
15
-10
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 defucose
1D4 (IgG1)

Fig. 5

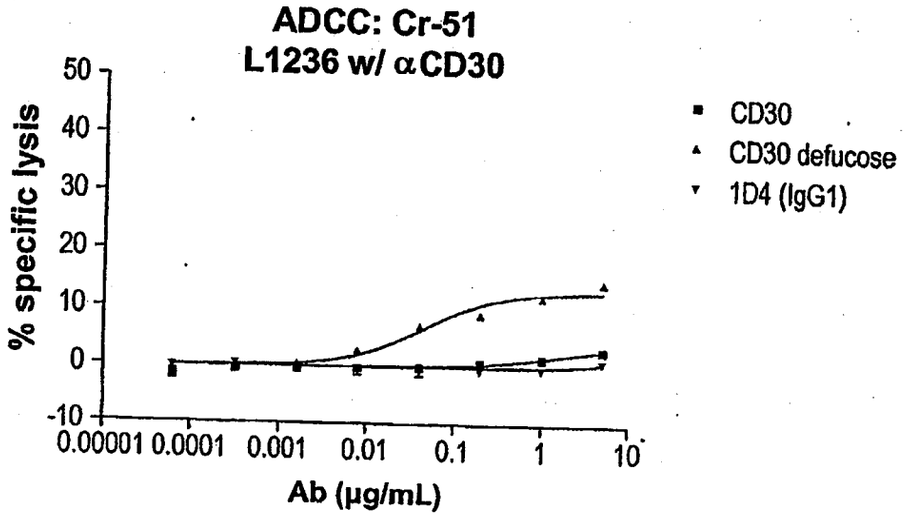

ADCC: Cr-51
L1236 w/ αCD30
% specific lysis
50
40
30
20
10
0
-10
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 defucose
1D4 (IgG1)

Fig. 6

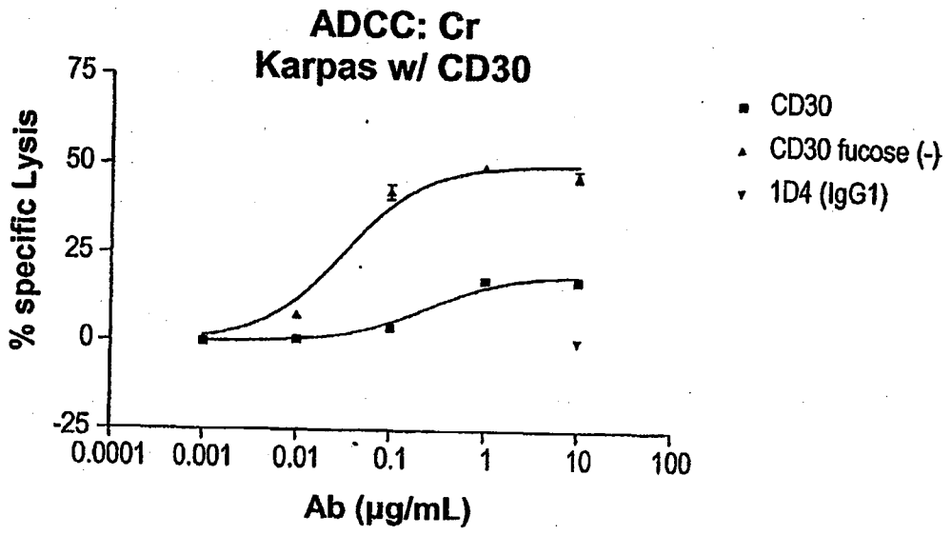

ADCC: Cr
Karpas w/ CD30
% specific Lysis
75
50
25
0
-25
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 fucose (-)
1D4 (IgG1)

Fig. 7

110

Heavy Chain Germline Sequences

4-34 Germline:

Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S

W I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S

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

CDR1 CDR2 CDR3

3-07 Germline:

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M S W

V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R

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

CDR1 CDR2

Fig. 8A

Light Chain Germline Sequences

L6 germline:

```
                                                    CDR1
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
                    CDR2
W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
                                        CDR3
T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W
```

A27 Germline:

```
                CDR1                                CDR2
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT
                                    CDR3
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSS
```

L15 Germline:

```
                CDR1                                CDR2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIY AASSLQS
                                    CDR3
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSY
```

Fig. 8B

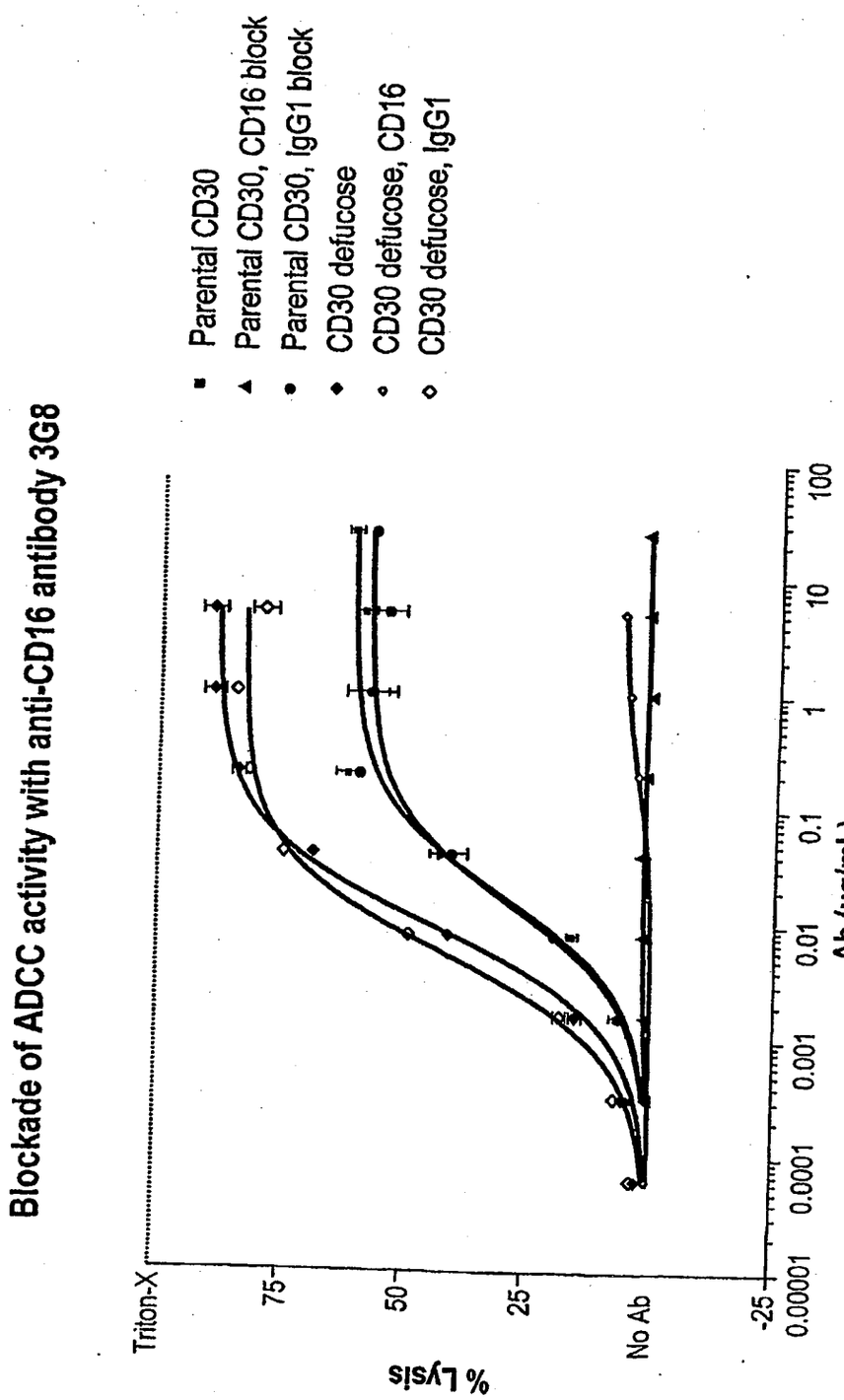

Blockade of ADCC activity with anti-CD16 antibody 3G8
Parental CD30
Parental CD30, CD16 block
Parental CD30, IgG1 block
CD30 defucose
CD30 defucose, CD16
CD30 defucose, IgG1
Triton-X
75
50
25
No Ab
-25
% Lysis
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (µg/mL)
EC50
0.01811
0.009528
Parental CD30
Fucose minus CD30

Fig. 9

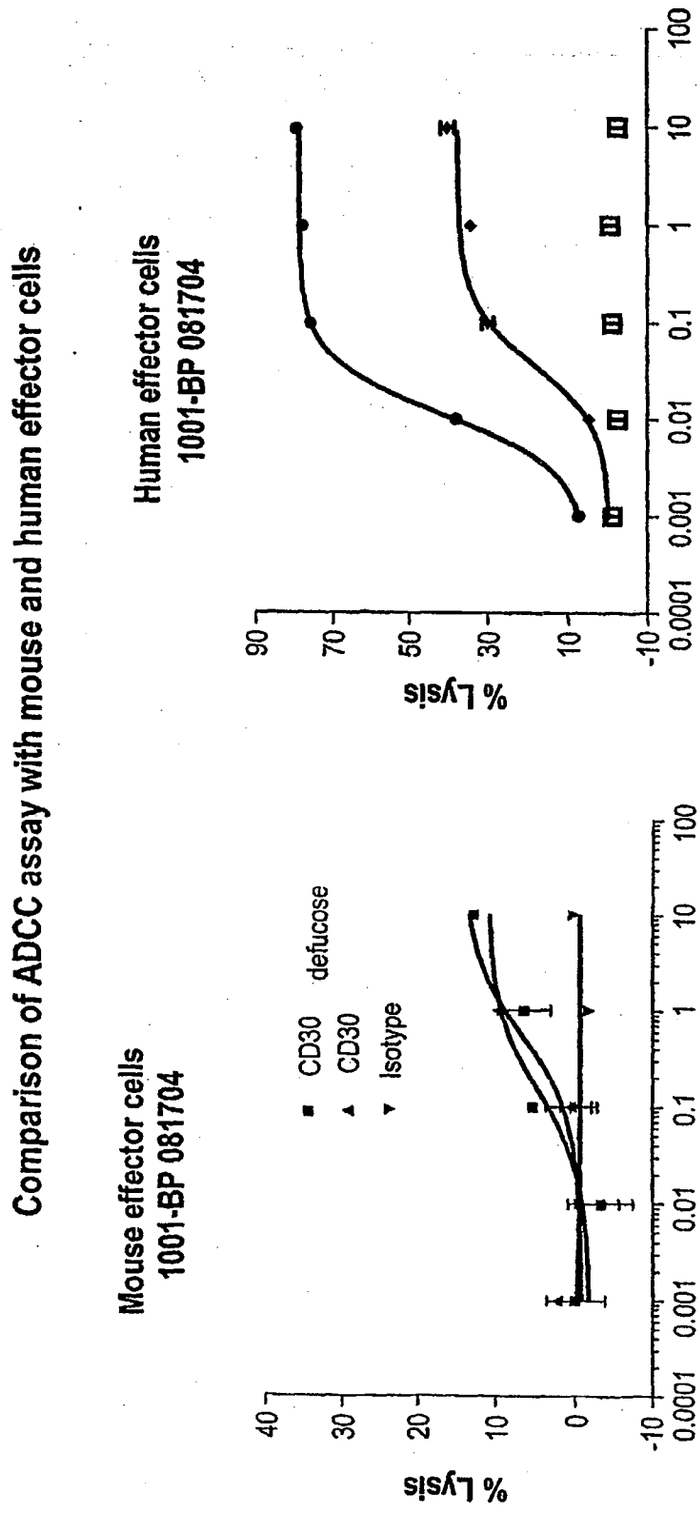
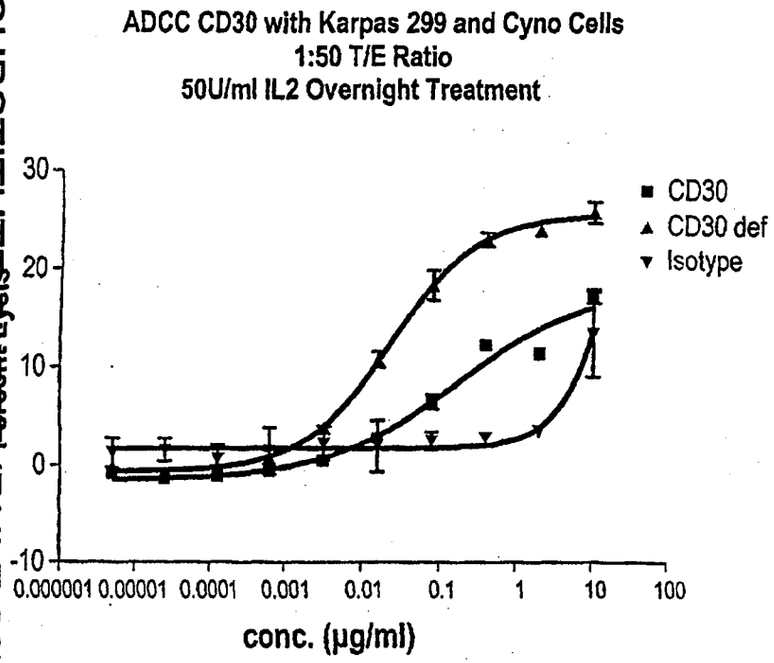

Comparison of ADCC assay with mouse and human effector cells
Mouse effector cells
1001-BP 081704
CD30 defucose
CD30
Isotype
% Lysis
Ab (µg/mL)
Human effector cells
1001-BP 081704
% Lysis
Ab (µg/mL)
percent specific = (sample - no Ab) / (Triton-x - no Ab) x 100%

Fig. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

ADCC assay using cynomolgus blood

Experiment #1



Experiment #2

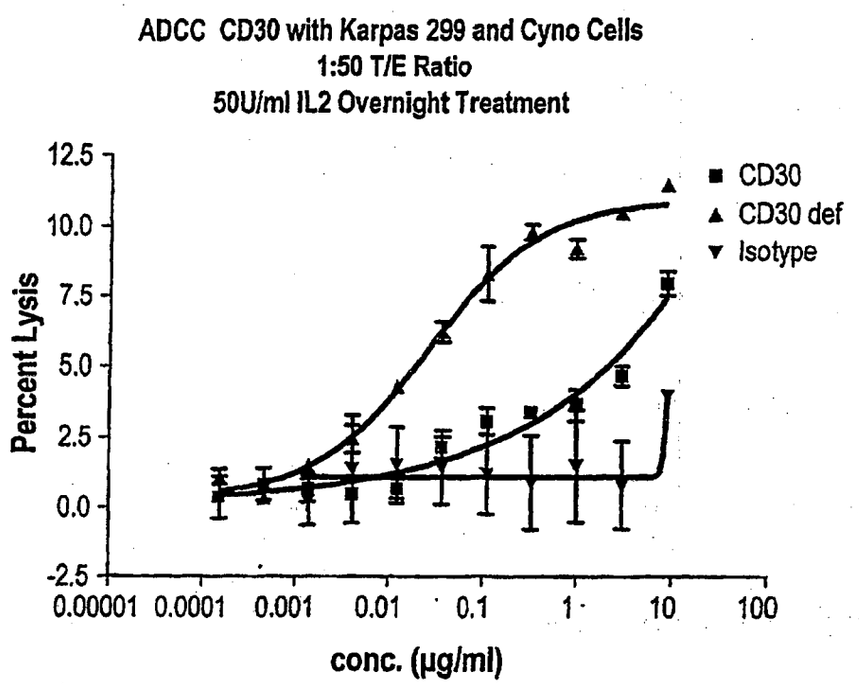


Fig. 11

SEQUENCE LISTING

<110> MEDAREX, INC.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

<130> MXI-333PC

<140>
<141>

<150> 60/654,197
<151> 2005-02-18

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Ser Leu Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
            20                  25                  30

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

Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

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

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
  1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

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

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

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

<400> 5
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

<400> 6
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

<400> 7
Ala Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Asn Ser Trp Met Ser
1 5

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

<400> 9
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

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

<400> 12
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

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

<400> 13
Leu Thr Ala Tyr
1

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

<400> 14
Val His Trp Tyr Phe His Leu
1 5

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

<400> 15
Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5

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

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

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

<400> 18
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

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

<400> 19
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

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

<400> 20
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

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

<400> 21
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

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

<400> 22
Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5

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

<400> 23
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 26
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

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

<400> 27
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90

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

<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser
85 90 95

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

<400> 29
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
85 90

<210> 30
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 30
```
cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag   48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
  1               5                  10                  15

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

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

ggg gac atc aat cat ggt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag   192
Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg   240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

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

agc cta act gcc tac tgg ggc cag gga agc ctg gtc acc gtc tcc tca   336
Ser Leu Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 31
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 31
```
gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg   48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tct   96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
            20                  25                  30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg   144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

```
gcc aac ata aac gaa gat gga agt gag aaa ttc tat gtg gac tct gtg   192
Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc ttc tcc aga gac aac gcc gag aac tca ctg tat   240
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
 65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg agg gtt cat tgg tac ttc cat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc   336
Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

act gtc tcc tca                                                   348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 32
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

act gtc tcc tca                                                   348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 33
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 34
```
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg   48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 35
```
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg   48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1               5                  10                  15

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

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

```
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ctc agt ggc   192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Leu Ser Gly
     50                  55                  60

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

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt caa cag cgt agc aac tgg ccg tgg   288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
                 85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE CARECEN DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA CD30

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

CD30 es una glucoproteína transmembranal tipo I con seis (humana) o tres (murina y de rata) repetidos ricos en cisteína con una secuencia de bisagra central. CD30 existe como una molécula membranal de 120 kDa que se desarrolla a partir de una proteína precursora intercelular de 90 kDa. Se secreta de la superficie celular como una proteína soluble (CD30s) de aproximadamente 90 kDa. La secreción de CD30s se presenta como un proceso activo de células CD30 viables y no meramente causado por la liberación de células que están muriendo o ya muertas. Los ADNc que codifican la proteína

CD30 se han clonado de bibliotecas de expresión de la línea HUT-102 de células T humanas HLTV-1 al inmunotamizar con anticuerpos monoclonales Ki-1 y Ber-H2 (Schwab, U., et al. Nature 299:65 (1982)). Se ha encontrado que el ADNc de CD30 de ratón y rata codifica 498 y 493 aminoácidos, respectivamente. El ADNc de CD30 humano codifica 90 aminoácidos adicionales, parcialmente duplicados de uno de los dominios ricos en cisteína. El gen CD30 se ha mapeado a 1p36 en humanos y 5q36.2 en ratas.

CD30 se expresa de preferencia por células linfoides activadas. Específicamente, se ha mostrado que la estimulación de CD30 en células linfoides induce efectos biológicos pleiotrópicos, incluyendo proliferación, activación, diferenciación y muerte celular, dependiendo del tipo celular, fase de diferenciación y presencia de otros estímulos (Gruss, H.J. et al., Blood 83:2045-2056 (1994)). CD30 se identificó originalmente por el anticuerpo monoclonal Ki-1, que es reactivo con antígenos expresados en células de Hodgkin y Reed-Sternberg de la enfermedad de Hodgkin (Schwab et al., Nature 299:65 (1982)). En consecuencia, CD30 se utiliza ampliamente como un marcador clínico para linfoma de Hodgkin y neoplasias malignas hematológicas relacionadas (Froese et al., J. Immunol. 139:2081 (1987); Carde et al., Eur. J. Cancer 26:474 (1990)).

Se demostró subsecuentemente que CD30 se expresa en un subgrupo de linfomas no de Hodgkin (NHL), incluyendo linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de célula grande (ALCL), linfomas cutáneos de células T, linfomas de célula hendida pequeña nodular, linfomas linfocíticos, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T del adulto (T-ALL) y linfomas foliculares entroblásticos/centrocíticos (cb/cc) (Stein et al., Blood 66:848 (1985); Miettinen, Arch. Pathol. Lab. Med. 116:1197 (1992); Piris et al., Histopathology 17:211 (1990); Burns et al, Am. J. Clin. Pathol. 93:327(1990); y Eckert et al., Am. J. Dermatopathol. 11:345 (1989)), así como también diversas líneas transformadas de manera viral tales como células T humanas transformadas con Virus I o II Linfotrófico de Células T y células B transformadas con Virus de Epstein-Barr (Stein et al., Blood 66:848 (1985); Andreesen et al., Blood 63:1299 (1984)). Además, la expresión de CD30 se ha documentado en carcinomas embrionarios, carcinomas no embrionarios, melanomas malignos, tumores mesenquimales, y líneas celulares mieloides y macrófagos en fases tardías de diferenciación (Schwarting et al., Blood 74:1678 (1989); Pallesen et al., Am J. Pathol. 133:446 (1988); Mechtersheimer et al., Cancer 66:1732 (1990); Andreesen et al., Am. J. Pathol. 134:187

(1989)).

Ya que el porcentaje de células positivas a CD30 en individuos normales es bastante pequeño, la expresión de CD30 en células tumorales lo vuelve un objetivo importante para terapia mediada por anticuerpos para dirigir específicamente agentes terapéuticos contra células neoplásicas positivas a CD30 (Chaiarle, R., et al. Clin. Immunol. 90(2):157-164 (1999)). Se ha mostrado que la terapia mediada por anticuerpos incrementa la citotoxicidad de células positivas a CD30 por activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Pohl C., et al. Int J Cancer 54:418 (1993)). Sin embargo, mientras que los resultados obtenidos a la fecha claramente establecen a CD30 como un objetivo útil para inmunoterapia, muestran también que los anticuerpos murinos actualmente disponibles no constituyen agentes terapéuticos ideales. La terapia pasiva con anticuerpos no ha sido efectiva *in vitro* o *in vivo* contra pacientes con enfermedad de Hodgkin refractaria. Una prueba clínica del anticuerpo anti-CD30 Ber-H2 mostró localización del anticuerpo, pero no respuestas (Falini B. et al.(1992) Brit J Haematol. 82:38-45; Koon, H.B. et al. (2000) Curr Opin in Oncol. 12:588-593). A través del acoplamiento de un anticuerpo anti-CD30 a una toxina Ricina-toxina de cadena A desglucosilada, se mostró citotoxicidad en el tratamiento de la Enfermedad de

Hodgkin humana en un modelo de ratón SCID, aunque toxicidades de grado 3 se observaron también en los sujetos (Schell, R. et al. (2002) Annals of Oncology 13:57-66).

En consecuencia, existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos mejorados contra CD30 que sean más efectivos para tratar y/o prevenir enfermedades mediadas por CD30.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona anticuerpos desfucosilados aislados (es decir, anticuerpos que carecen de residuos de fucosa) que se unen a CD30 humano y exhiben eliminación por citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos (ADCC) intensificada de células que expresan CD30, en comparación con la forma no desfucosilada del anticuerpo (es decir, anticuerpos que contienen residuos de fucosa). También se proporcionan métodos para tratar una diversidad de enfermedades que involucran expresión de CD30 utilizando los anticuerpos y composiciones de la invención.

En un aspecto, la invención concierne a un anticuerpo monoclonal desfucosilado aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se une a CD30 humano con una K_D de $10x10^{-8}$ M o menos, de más preferencia $1x10^{-8}$ M o menos, de más preferencia $5x10^{-9}$ o menos o incluso de más preferencia, $1x10^{-9}$ o menos.

Los anticuerpos desfucosilados de la presente

invención se unen a CD30 e inhiben el crecimiento de células que expresan CD30 al intensificar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas (por ejemplo, monocitos o células mononucleares) en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo desfucosilado media ADCC incrementada de células que expresan CD30 en presencia de células efectoras humanas pero no en presencia de células efectoras de ratón.

En una modalidad preferida, un anticuerpo desfucosilado de la invención induce ADCC de células L1236 *in vitro* en donde la forma fucosilada del anticuerpo no induce ADCC, bajo condiciones de una concentración de anticuerpo de 0.1 µg/ml y una proporción célula objetivo a célula efectora de 1:50. En otra modalidad preferida, un anticuerpo desfucosilado de la invención intensifica la ADCC de células L540, L428 y Karpas *in vitro* comparado con la forma fucosilada del anticuerpo, bajo condiciones de una concentración de anticuerpo de 0.1 µg/ml y una proporción célula objetivo a célula efectora de 1:50. En consecuencia, los anticuerpos de la presente invención proporcionan un medio mejorado para tratar trastornos caracterizados por expresión de CD30.

Preferiblemente, el anticuerpo desfucosilado de la invención es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, la

invención concierne a un anticuerpo monoclonal humanizado o quimérico. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o quimérico se prepara a partir de un anticuerpo anti-CD30 de ratón seleccionado del grupo que consiste de: AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, Ber-H8. En otro aspecto, la invención concierne a un anticuerpo monoclonal humano.

En una modalidad de la invención, el anticuerpo monoclonal humano comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 1, 2 y 3; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 4, 5 y 6.

en donde el anticuerpo une CD30 y carece de residuos de fucosa.

Una combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido de SEC. DE IDENT. NO.: 1; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácido de SEC. DE

IDENT. NO.: 4.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido de SEC. DE IDENT. NO.: 2; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácido de SEC. DE IDENT. NO.: 5.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido de SEC. DE IDENT. NO.: 3; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácido de SEC. DE IDENT. NO.: 6.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3; y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR1 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de amino ácido de SEC. DE IDENT. NOS.: 7, 8, y 9;

(b) la secuencia CDR2 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de amino ácido de SEC. DE IDENT. NOS.: 10, 11, y 12;

(c) la secuencia CDR3 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de amino ácido de SEC. DE IDENT. NOS.: 13, 14, y 15;

(a) la secuencia CDR1 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de amino ácido de SEC. DE IDENT. NOS.: 16, 17, y 18;

(a) la secuencia CDR2 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de amino ácido de SEC. DE IDENT. NOS.: 19, 20, y 21; y

(a) la secuencia CDR3 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de amino ácido de SEC. DE IDENT. NOS.: 22, 23, y 24;

en donde el anticuerpo une CD30 y carece de residuos fucosa.

Una combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:7;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:10;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:13;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:16;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:19; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:22.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:8;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:11;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:14;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:17;

(e) una región variable de cadena ligera humana

CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:20; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:23.

Aún otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:9;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:12;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:15;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:18;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:21; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:24.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD30 humano desfucosilado que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 4-34 o V_H 3-07 humano. La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD30 humano desfucosilado que comprende una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L15, A27 o L6 humano. La invención aún además proporciona un anticuerpo anti-CD30 humano desfucosilado que comprende

una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 4-34 o V_H 3-07 humano y una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L15, A27 o L6 humano.

En otro aspecto, la invención concierne a una célula huésped que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-CD30, en donde la célula huésped carece de una fucosiltransferasa de manera que el anticuerpo anti-CD30 expresado por la célula huésped carece de residuos de fucosa. Preferiblemente, los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, la fucosiltransferasa es FUT8. Preferiblemente, la célula huésped es una célula CHO.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células $CD30^+$. El método involucra contactar las células con un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en un sujeto. El método involucra administrar al sujeto

un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en el sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano. En modalidades preferidas, las células tumorales son células tumorales de Enfermedad de Hodgkin (HD) o células tumorales de linfoma de célula grande anaplásico (ALCL).

Otras características y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no deben interpretarse como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, entradas de Genbank, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente para referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótido (SEC. DE IDENT. NO.: 30) y secuencia de amino ácido (SEC. DE IDENT. NO.: 1) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F11. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO.: 7), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO.: 10) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO.: 13) se delinean y las derivaciones de línea germinal V, D y J se indican.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótido (SEC. DE IDENT. NO.: 33) y secuencia de amino ácido (SEC.

DE IDENT. NO.: 4) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo ƒ monoclonal humano 5F11. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO.: 16), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO.: 19) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO.: 22) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J, se indican.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótido (SEC. DE IDENT. NO.: 31) y secuencia de amino ácido (SEC. DE IDENT. NO.: 2) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo ƒ monoclonal humano 17G1. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO.: 8), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO.: 11) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO.: 14) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J, se indican.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótido (SEC. DE IDENT. NO.: 34) y secuencia de amino ácido (SEC. DE IDENT. NO.: 5) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo ƒ monoclonal humano 17G1. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO.: 17), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO.: 20) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO.: 23) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J, se indican.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótido (SEC. DE IDENT. NO.: 32) y secuencia de amino ácido (SEC. DE IDENT. NO.: 3) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo ƒ monoclonal humano 2H9. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO.: 9), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO.: 12) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO.: 15) se delinean y las

derivaciones de línea germinal V, D, y J, se indican.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótido (SEC. DE IDENT. NO.: 35) y secuencia de amino ácido (SEC. DE IDENT. NO.: 6) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo ƒ monoclonal humano 2H9. Las regiones (SEC. DE IDENT. NO.: 18), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO.: 21) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO.: 24) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J, se indican.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la actividad de eliminación celular citotóxica de las formas fucosiladas y desfucosiladas de 5F11 en el linfoma L540 de línea celular humana Hodgkin, en comparación con un anticuerpo control correlacionado con isotipo (1D4).

La Figura 5 es una gráfica que muestra la actividad de eliminación celular citotóxica de las formas fucosiladas y desfucosiladas del 5F11 en el Linfoma L428 de Línea celular humana Hodgkin, en comparación con un anticuerpo control correlacionado con isotipo (1D4).

La Figura 6 es una gráfica que muestra la actividad de eliminación celular citotóxica de las formas fucosiladas y desfucosiladas de 5F11 en la línea celular de linfoma de Hodgkin L1236 humano, en comparación con un anticuerpo control correlacionado con isotipo (1D4).

La Figura 7 es una gráfica que muestra la actividad de eliminación celular citotóxica de las formas

fucosiladas y desfucosiladas de la línea celular 5F11 de linfoma de célula T humana Karpas, en comparación con un anticuerpo control correlacionado con isotipo (1D4).

Las Figuras 8A-8B muestran las secuencias de amino ácido de las líneas germinales humanas VH 3-11, VK L15, VK A27, y VK L6 (SEC. DE IDENT. NOS.:25-29, respectivamente), the CDRs, se delinean.

La Figura 9 es una gráfica que muestra el bloqueo de la actividad de ADCC con un anticuerpo anti-CD16.

La Figura 10 es una gráfica que muestra la actividad de eliminación celular citotóxica de las formas fucosiladas y desfucosiladas de 5F11 en presencia de ratón (panel izquierdo) o células efectoras (panel derecho) humanas.

La Figura 11 es una gráfica que muestra un ensayo de ADCC utilizando sangre de macaco.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona composiciones de anticuerpos y mejoradas asociadas con CD30 y/o células que expresan CD30. Los anticuerpos de la invención carecen de residuos fucosilo en las cadenas de carbohidratos del anticuerpo. Adicionalmente, los anticuerpos exhiben eliminación citotóxica celular dirigida por anticuerpos (ADCC) intensificada de células CD30+. En una modalidad

particular, el anticuerpo de la presente invención es capaz de eliminar células CD30+ bajo condiciones en las que la forma fucosilada del anticuerpo no puede eliminar efectivamente células CD30+. En otra modalidad, el anticuerpo de la invención actual intensifica la eliminación de células CD30+ comparado con la forma fucosilada del anticuerpo. En una modalidad, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos completamente humanos y son particularmente útiles para el tratamiento terapéutico en humanos de trastornos asociados con células que expresan CD30. Métodos para utilizar anticuerpos anti-CD30 que carecen de residuos fucosilo para tratamiento terapéutico (por ejemplo, para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con la expresión de CD30) también se contemplan por la invención.

A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definirán como sigue. Definiciones adicionales se establecen a lo largo de la descripción detallada.

Los términos "CD30" y "antígeno CD30" se utilizan de manera intercambiable en la presente e incluyen cualesquiera variantes, isoformas y especies homólogas de CD30 humano que se expresan de manera natural por las células. La secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD30 humana tiene el número de acceso de Genbank NP_001234.

La secuencia de ADNc completa que codifica la proteína CD30 humana tiene el número de acceso de Genbank NM_001243.

Como se utilizan en la presente, los términos "anticuerpo que carece de residuos de fucosa" y "anticuerpo desfucosilado" se utilizan de manera intercambiable y pretenden referirse a un anticuerpo en el que la porción de carbohidratos del anticuerpo no contiene un residuo fucosilo o en el cual el residuo fucosilo se ha eliminado. Un anticuerpo que carece residuos de fucosa puede generarse, por ejemplo, por expresión del anticuerpo en una célula o sistema de expresión que minimiza o no une residuos fucosilo a la cadena de carbohidratos del anticuerpo, o por modificación química del anticuerpo para eliminar residuos fucosilo de la cadena de carbohidratos (por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con una fucosidasa). Como tales, los términos "carece de residuos de fucosa" y "desfucosilado" no pretenden limitarse por el mecanismo por el cual el anticuerpo con estructura alterada de carbohidratos se prepara.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo que expresa residuos de fucosa" y "anticuerpo fucosilado" se utilizan de manera intercambiable y pretenden referirse a un anticuerpo en el que la porción de carbohidratos del anticuerpo contiene fucosa.

El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de

antígeno, células fagocitarias, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas, y complementos) que resulta en daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con tejidos, células cancerosas, o en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Como se utiliza en la presente, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmune que se involucra en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de un origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T incluyendo células T citolíticas (CTLs)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinofilos, neutrofilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basofilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En modalidades preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos y macrófagos, los cuales expresan FcR se involucran en eliminación específica

de células objetivo y presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune, o unión a células que presentan antígenos. En otras modalidades, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo o célula objetivo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, la expresión de FcaRI se ha encontrado sobre regulada por G-CSF o GM-CSF. Esta función intensificada incrementa la función efectora de las células que llevan FcαR1 contra objetivos. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno objetivo o una célula objetivo.

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

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una reacción citotóxica mediada por células en la que una célula objetivo CD30+ con anticuerpo anti-CD30 unido se reconoce por una célula efectora que lleva receptores Fc y se lisa subsecuentemente sin requerir la intervención del complemento.

Como se utiliza en la presente, el término

"intensifica la ADCC" (por ejemplo, en referencia a las células) pretende incluir cualquier incremento medible en lisis celular cuando se contactan con un anticuerpo anti-CD30 que carecen de residuos fucosilo en comparación con la eliminación celular de la misma célula en contacto con un anticuerpo anti-CD30 fucosilado en la presencia de células efectoras (por ejemplo, en una proporción de células objetivo: células efectoras de 1:50), por ejemplo, un incremento en lisis celular en por lo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, o 325%.

El término "anticuerpo" según se refiere en la presente incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada se comprende de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se comprende de tres dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera se comprende de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena

ligera se comprende de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden además subdividirse en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que se encuentran más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD30). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1};

(ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de la bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_{HI}; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de un dominio V_H; y (vi) una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite elaborarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena Fv sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también pretenden contemplarse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para aquellos con experiencia en la técnica, y los fragmentos se tamizan por utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos

humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado del mismo (descrito además en lo siguiente), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre, empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden sujetarse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando un animal transgénico para secuencias de Ig humana se utiliza, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan con las secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos

humanos *in vivo*.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" como se utiliza en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpos monoclonales muestra una sola especificidad de unión y afinidad por un epítopo en particular.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, pretende referirse un anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatoria o dirigida o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una modalidad,

los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada. El término "anticuerpo monoclonal humano", como se utiliza en la presente, también incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanas o un hibridoma preparado del mismo (descrito además en lo siguiente), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una librería de anticuerpos humanos combinatoria, recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden sujetarse a mutagénesis *in vitro* (o,

cuando un animal transgénico para secuencias de Ig humana se utiliza, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan con secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en la presente, pretende referirse a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD30 es sustancialmente libre de anticuerpos que unen específicamente antígenos diferentes al CD30). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítopo, isoforma o variante de CD30 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otra especie (por ejemplo, homólogos de especie de CD30). Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades se combinan en una composición bien definida.

El término "anticuerpo humanizado" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas. Modificaciones adicionales a la región de armazón pueden hacerse dentro de las secuencias de armazón humanas.

El término "anticuerpo quimérico" pretende referirse un anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término "epítopo" significa un determinante de proteína capaz de unión específica a, o unión específica por, un anticuerpo. Los epítopos usualmente consisten de agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específica. Epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en la presencia de solventes desnaturalizantes.

Como se utiliza en la presente, "unión específica"

se refiere a unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es por lo menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente al antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan de manera intercambiable en la presente con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se utiliza en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgGI) que se codifica por genes de región constante de cadena pesada.

El término "vector", como se utiliza en la presente, pretender referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es una "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula

huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped en la introducción en la célula huésped, y en consecuencia se replican junto con genoma huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en la forma de plásmidos. En la especificación presente, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que desempeñan funciones equivalentes.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se utiliza en la presente, pretende referirse a una célula en la que un vector de expresión recombinante se ha introducido. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo a la célula

sujeto en particular sino a la progenie de tales células. Ya que ciertas modificaciones pueden presentarse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se utiliza en la presente. Células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, célula CHOs, transfectomas, y células linfocíticas.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, anfibios, reptiles, etc.

Los términos "animal no humano transgénico" se refieren a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (ya sea integrado o no integrado en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpo completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgen de cadena ligera humana y ya sea un transgen de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-CD30 humanos cuando se inmuniza con antígeno CD30 y/o células que expresan CD30. El

transgen de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como en el caso de, por ejemplo, ratones HuMAb transgénicos, o el transgen de cadena pesada humana puede mantenerse de manera extracromosomal, como en el caso de ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) según se describe en WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir isotipos múltiples de anticuerpos monoclonales humanos para CD30 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) al experimentar recombinación V-D-J y conmutación de isotipo.

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

Anticuerpos Anti-CD30 que Carecen de Residuos de Fucosa y que Tienen Actividad ADCC Intensificada

La presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado con citotoxicidad celular dirigida por anticuerpo (ADCC) intensificada contra células que expresan CD30 en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo. En una modalidad preferida, un anticuerpo desfucosilado de la invención induce la ADCC de células L1236 *in vitro* en donde la forma fucosilada del anticuerpo no induce ADCC, bajo condiciones de una concentración de anticuerpo de 0.1 μg/ml y una proporción célula objetivo a célula efectora de 1:50. En otra modalidad preferida, un

anticuerpo desfucosilado de la invención intensifica la ADCC de células L540, L428 y Karpas *in vitro* comparado con la forma fucosilada del anticuerpo, bajo condiciones de una concentración de anticuerpo de 0.1 μg/ml y una proporción célula objetivo a célula efectora de 1:50.

La actividad ADCC incrementada de un anticuerpo desfucosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como un incremento en porcentaje de lisis celular, en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo, cuando la actividad ADCC se mide bajo las mismas condiciones para las forma desfucosilada y fucosilada (por ejemplo, mismas concentraciones de anticuerpo y mismas proporciones de célula objetivo a efectora). De preferencia, un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado de la invención incrementa el porcentaje de lisis de células CD30+ en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo por lo menos 1.25 veces (es decir, la proporción del % de lisis de la forma desfucosilada a la forma fucosilada es por lo menos 1.25), más preferiblemente por lo menos 2 veces, incluso más preferiblemente por lo menos 2.5 veces e incluso más preferiblemente por lo menos 3 veces. En diversas modalidades, la forma desfucosilada del anticuerpo incrementa el porcentaje de lisis de células CD30+ en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo de 1.25 a 3.25 veces, de preferencia 1.5 a 3.25 veces, incluso de más preferencia 1.61 a 3.25 veces, incluso de más preferencia

2.15 a 3.25 veces, e incluso de más preferencia 2.63 a 3.25 veces, de preferencia bajo condiciones donde el anticuerpo esté a una concentración de 25 μg/ml y la proporción célula objetivo a efectora sea 1:50.

Adicional o alternativamente, la actividad ADCC incrementada de un anticuerpo desfucosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como una potencia incrementada al medirse por una disminución en el valor de EC_{50} para la forma desfucosilada, en comparación con la forma fucosilada. Esto puede cuantificarse por la proporción de la EC_{50} para la forma fucosilada a la forma desfucosilada. Preferiblemente, la proporción EC_{50} de la forma fucosilada a la forma desfucosilada para ADCC de células CD30+ es por lo menos 3 (es decir, la EC_{50} de la forma fucosilada es 3 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada), de más preferencia, por lo menos 4, incluso de más preferencia por lo menos 5, por lo menos 7, por lo menos 10, por lo menos 15 o por lo menos 20. En diversas modalidades, la proporción EC_{50} de la forma fucosilada a la forma desfucosilada para ADCC de células CD30+ es de 2 a 27.1, de más preferencia de 4 a 27.1, incluso de más preferencia de 4.7 a 27.1, incluso de más preferencia de 7.8 a 27.1 e incluso de más preferencia de 11.1 a 27.1. De preferencia, los valores de EC50 se determinan en ensayos de ADCC que utilizan una proporción de célula objetivo a efectora de 1:50 y concentraciones de

anticuerpo de 0.0001 µg/ml a 10 µg/ml o más altas.

Ejemplos de líneas celulares CD30+ que pueden utilizarse en los ensayos de ADCC de la invención y contra las que un anticuerpo desfucosilado de la invención exhibe actividad ADCC intensificada, en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo, incluyen células L540 (linfoma de Hodgkin humano; Depósito DSMZ No. ACC 72), células L428 (linfoma de Hodgkin humano; Depósito DSMZ No. ACC 197), células L1236 (linfoma de Hodgkin humano; Depósito DSMZ No. ACC 530) y células Karpas (linfoma de células T humano; Depósito DSMZ No. ACC 31). La ADCC intensificada efectuada por anticuerpos anti-CD30 desfucosilados puede resultar en actividad ADCC sobre células CD30+ en concentraciones de anticuerpo donde la ADCC puede no observarse con la forma fucosilada del anticuerpo. Por ejemplo, en un ensayo de ADCC *in vitro*, con una proporción de célula objetivo:efectora de 1:50, la ADCC debida a un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado se observa con la línea celular L1236 CD30+ a concentraciones tan bajas como 0.005 µg/ml, mientras que no se detecta actividad ADCC con el anticuerpo anti-CD30 fucosilado a concentraciones tan altas como 0.1 µg/ml.

Desfucosilación de Anticuerpos Anti-CD30

Los anticuerpos anti-CD30 (por ejemplo, anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y humanos) se conocen en la

técnica, y pueden utilizarse en la presente invención. El anticuerpo anti-CD30 de la presente invenciones modifica de manera que el anticuerpo carecen de residuos fucosilo. Un anticuerpo puede elaborarse de manera que carezca de residuos fucosilo por uno de una diversidad de métodos. Por ejemplo, el anticuerpo puede expresarse utilizando tecnología de ADN recombinante, en una célula con un mecanismo de glucosilación alterado de manera que la adición de residuos fucosilo a cadenas de carbohidratos se inhiba. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede desfucosilarse a través de eliminación química del residuo fucosilo.

En una modalidad, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de manera que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares $FUT8^{-/-}$ Ms704, Ms705, y Ms709 se crearon por la interrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo (véase la Publicación de Patente Norteamericana No. 20040110704 por Yamane et al. y Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como otro ejemplo, EP 1,176,195 por Hanai et al. describe

una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6. Hanai et al. También describe líneas celulares que también tienen de manera natural una baja actividad enzimática para agregar mucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). La Publicación de PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), lo que resulta también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación de PCT WO 99/54342 por Umana et al. Describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosil transferasas de modificación de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas exhiben estructuras GlcNac divididas incrementadas que resultan en actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-

180).

En otra modalidad, un anticuerpo anti-CD30 se expresa y el o los residuos fucosilo se escinden utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Adicionalmente, en otras modalidades, otras formas de glucosilación de un anticuerpo se modifican también. Por ejemplo, un anticuerpo glucosilado puede elaborarse (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos pueden hacerse que resulten en eliminación de uno o más sitios de glucosilación de armazón de región variable para eliminar en consecuencia la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal estrategia se describe en mayor detalle en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,714,350 y 6,350,861 por Co et al.

Caracterización de la Ausencia de Residuos fucosilo en Anticuerpos Anti-CD30

Los anticuerpos de la invención carecen de residuos fucosilo, por ejemplo en la cadena de carbohidratos de la

porción Fc. Los anticuerpos pueden probarse por la ausencia de residuos fucosilo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como fluorescencia inducida por láser en electroforesis capilar con APTS. Brevemente, los oligosacáridos enlazados a N del anticuerpo anti-CD30 purificado pueden liberarse al agregar el péptido N-glicanasa (Prozyme) e incubar durante la noche. Los carbohidratos se resuspenden y se derivan con 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonato (APTS) bajo condiciones suaves de aminación reductiva en las que la desialilación y pérdida de residuos fucosilo se minimiza. Los aductos de la reacción se analizan por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducida por láser (Beckman Coulter). Una ausencia de fucosa puede observarse por un cambio en la electroforesis en comparación con el mismo anticuerpo que contienen fucosa. Otra técnica para probar la ausencia de fucosa en anticuerpos anti-CD30 es un análisis de monosacáridos utilizando HPLC. Ensayos adecuados para determinar la unión a CD30 se describen además en los Ejemplos.

Caracterización de Eliminación Celular Dependiente de Anticuerpos de Células CD30+

Los anticuerpos anti-CD30 desfucosilados pueden probarse por su capacidad para mediar fagocitosis y eliminación de células que expresan CD30. En una modalidad,

un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado intensifica la eliminación de células que expresan CD30 en comparación con el mismo anticuerpo que contiene fucosa cuando se compara en la misma concentración. En otra modalidad, un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado induce eliminación de células que expresan CD30 donde el mismo anticuerpo que contienen fucosa no induce eliminación celular en la misma concentración.

La actividad ADCC de un anticuerpo monoclonal puede probarse en ensayos *in vitro* establecidos. Como un ejemplo, un ensayo de ADCC de liberación de cromo puede utilizarse. Brevemente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), u otras células efectoras, de donadores sanos pueden purificarse por centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque, seguida por lisis de eritrocitos contaminantes. Las PBMCs lavadas puede suspenderse en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado con calor y mezclarse con células que expresan CD30 etiquetadas con ^{51}Cr, en diversas concentraciones de células efectoras a células tumorales (células efectoras:células tumorales). El anticuerpo anti-CD30 puede entonces agregarse en varias concentraciones. Un anticuerpo correlacionado con isotipo puede utilizarse como un control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4-18 horas a 37°C. Las muestras pueden ensayarse para citólisis al medir el ^{51}Cr liberado en el sobrenadante de cultivo. El anti-CD30

monoclonal puede también probarse en combinaciones entre sí para determinar si la citólisis se intensifica con múltiples anticuerpos monoclonales.

Un ensayo alternativo que puede utilizarse para la capacidad del anticuerpo anti-CD30 para mediar fagocitosis y muerte de células que expresan CD30 es un ensayo de fluorometría resuelta en tiempo. Brevemente, células que expresan CD30 se cargan con un acetoximetil éster de ligando de intensificación de fluorescencia (BATDA), que penetra las membranas celulares. Dentro de la célula, los enlaces éster se hidrolizan y el compuesto no puede pasar más la membrana celular. El anticuerpo anti-CD30 puede entonces agregarse en diversas concentraciones. Después de la citólisis, una solución de europeo (Perkin Elmer) se agrega y cualquier ligando libre se une al europeo para formar un quelato altamente fluorescente y estable (EuTDA) que puede leerse en un lector de microplacas (Perkin Elmer). La señal medida se correlaciona con la cantidad de células lisadas.

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

1) unión a células vivas que expresan CD30;

2) alta afinidad de unión a CD30;

3) unión a un epítopo único en el CD30 (para eliminar la posibilidad de que anticuerpos monoclonales con actividades complementarias cuando se utilizan en combinación pudieran competir por la unión al mismo epítopo);

4) internación por células que expresan CD30;

5) mediación de inhibición de crecimiento, fagocitosis y/o eliminación *in vitro* de células que expresan CD30 en la presencia de células efectoras humanas.

Los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención reúnen uno o más de estos criterios. En una modalidad particular, los anticuerpos monoclonales se utilizan en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CD30 o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-CD30 que tienen diferentes actividades, pero complementarias, pueden combinarse en una sola terapia para lograr un efecto terapéutico o de diagnostico deseado. Una ilustración de esto puede ser una composición que contienen un anticuerpo monoclonal anti-CD30 que media la eliminación altamente efectiva de células objetivos en la presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo monoclonal anti-CD30 que inhibe el crecimiento de células que expresan CD30.

Caracterización de la Unión a CD30

Los anticuerpos de la invención pueden probarse por su unión a CD30 por, por ejemplo, ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis de FACS y/o análisis Biacore. En un ensayo de ELISA típico, brevemente, placas de microvaloración se recubren con CD30 purificado a 0.25 μg/ml en PBS, y entonces se bloquean con 5% albúmina sérica bovina en PBS. Diluciones de anticuerpo se agregan a cada pozo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y se incuban entonces con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpo humanos o un reactivo policlonal específico de Fc anti-IgG humana de cabra) conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a una OD de 405-650.

A fin de mostrar la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan el CD30, puede utilizarse citometría de flujo. En un ejemplo típico (pero no limitante) de un protocolo de citometría de flujo, líneas celulares que expresan CD30 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contienen 0.1% de BSA y 20% de suero de ratón, y se incuba a 37°C durante 1 hora.

Después de lavar, las células se hacer reaccionar con anticuerpo secundario etiquetado con Fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humana) bajo las mismas condiciones que la tinción de anticuerpo primaria. Las muestras pueden analizarse por un instrumento FACScan utilizando luz y propiedades de dispersión lateral para sincronizarse sobre células sencillas. Un ensayo alternativo que utiliza microscopía de fluorescencia puede utilizarse (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describe en lo anterior y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida lo que depende de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-CD30 pueden además probarse por reactividad con antígeno CD30 por transferencia Westem. Por ejemplo, extractos celulares de células que expresan CD30 pueden prepararse y sujetarse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con 20% suero de ratón, y se sondean con los anticuerpos monoclonales que se probarán. La unión del anticuerpo puede probarse utilizando un anticuerpo secundario específico anti-especie enlazado a fosfatasa alcalina y revelado con

tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Otras técnicas para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia CD30 se conocen en la técnica, incluyendo análisis RIAs y Biacore. Ensayos adecuados para determinar la unión a CD30 se describen en detalle en los Ejemplos.

Anticuerpos Anti-CD30 Quiméricos o Humanizados

En ciertas modalidades, un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado de la invención es un anticuerpo quimérico humanizado. Tales anticuerpos pueden prepararse utilizando anticuerpos anti-CD30 de ratón que se encuentran disponibles en la técnica y procedimientos establecidos para convertir un anticuerpo de ratón a un anticuerpo quimérico o humanizado. Ejemplos no limitantes de tales anticuerpos anti-CD30 de ratón incluyen los anticuerpos monoclonales AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 y Ber-H8. Más aún, los anticuerpos anti-CD30 humanizados se describen en le Publicación PCT WO 02/4661.

Anticuerpos Anti-CD30 Monoclonales Humanos

Los anticuerpos preferidos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales anti-CD30 humanos. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-CD30 humanos incluyen los

anticuerpos 5F11, 17G1 y 2H9, aislados y estructuralmente caracterizados según se describe originalmente en la Publicación PCT WO 03/059282. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en las SEC. DE IDENT. NOS: 1, 2 Y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 4, 5 Y 6, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CD30, las secuencias V_H y V_L pueden "mezclarse y correlacionarse" para crear otras moléculas de unión anti-CD30 de la invención. La unión a CD30 de tales anticuerpos "mezclados y correlacionados" puede probarse utilizando los ensayos de unión bien conocidos en la técnica, tales como análisis de FACS y ensayos de ELISA. Preferiblemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y correlacionan, una secuencia V_H de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. Asimismo, de preferencia una secuencia V_L de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de V_H de 5F11 y 2H9 son particularmente accesibles para mezclar y correlacionar, ya que estos anticuerpos utilizan secuencias de V_H derivadas de la misma secuencia de línea germinal (V_H 4-34) y de esta manera exhiben similitud estructural.

En modalidades particulares, la invención

proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 1, 2 Y 3; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 4, 5 Y 6;

en donde el anticuerpo une específicamente CD30 humano.

Combinaciones de cadena pesada y ligera preferidas incluyen:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 1; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 4; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 2; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 5; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 3; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 6.

En otro aspecto, la invención proporciona

anticuerpos desfucosilados que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 5F11, 17G1 y 2H9, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 7, 8 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 10, 11 y 12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 13, 14 y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_K de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 16, 17 y 18, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_K de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 19, 20 y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_K de 5F11, 17G1 y 2H9 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 22, 23 y 24, respectivamente. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins de Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CD30 y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona de manera primera por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_H y secuencias CDR1, 2 y 3 de V_k pueden "mezclarse y correlacionarse" (es decir, las

CDRs de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y correlacionarse, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 de V_H y una CDR1, 2 y 3 de V_k) para crear otras moléculas de unión anti-CD30 de la invención. La unión a CD30 de tales anticuerpos "mezclados y correlacionados" puede probarse utilizando ensayos de unión conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de FACS y ensayos de ELISA. Preferiblemente, cuando las secuencias CDR de V_H se mezclan y correlacionan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_H particular se reemplaza con una o unas secuencias CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias CDR de V_k se mezclan y correlacionan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_k particular de preferencia se reemplaza con una o unas secuencias CDR estructuralmente similares. Será fácilmente aparente para el técnico con experiencia ordinaria que secuencias de V_H y V_L novedosas pueden crearse al sustituir una o más secuencias de región CDR de V_H y/o V_L CDR con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en la presente para anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1 y 2H9.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 7, 8 y 9;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 10, 11 y 12;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 13, 14 y 15;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 16, 17 y 18;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19, 20 y 21; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 22, 23 y 24;

en donde el anticuerpo une específicamente CD30.

En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 7;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 10;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que

comprende SEC. DE IDENT. NO: 13;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 16;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 19; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 22.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 8;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 11;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 14;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 17;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 20; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 24.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 9;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 12;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 15;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 18;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 21; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 24.

Anticuerpos que Tienen Secuencias de Línea Germinal Particulares

En ciertas modalidades, un anticuerpo desfucosilado de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un particular gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular.

Por ejemplo, en una modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_H 4-34 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humano. En otra

modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_H 3-07 humano, en donde el anticuerpo une específicamente CD30. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k L15 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humano. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k A27 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humano. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a CD30 humano.

En aún otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el

anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_H 4-34 o 3-07 humano (que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC. DE IDENT. NOS: 25 y 26, respectivamente);

(b) comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k L15, A27 o L6 humano (que codifica las secuencias de aminoácidos establecidas en SEC. DE IDENT. NOS: 27, 28 y 29, respectivamente); y

(c) se une específicamente a CD30 humano.

Una combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 4-34 y V_k L15. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 4-34 y V_k L15, respectivamente, es el anticuerpo 5F11. Otra combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 3-07 y V_k A27. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_k de V_H 3-07 y Vk A27, respectivamente, es el anticuerpo 17G1. Otra combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 4-34 y V_k L6. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_k de V_H 4-34 y V_k L6, respectivamente, es el anticuerpo 2H9.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utilice genes de

inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o tamizar una genoteca de inmunoglobulina humana desplegada en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal al comparar las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, utilizando la base de datos Vbase) y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias en aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que se presentan de manera natural o introducción intencionada de mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de

inmunoglobulina de línea germinal de otra especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser por lo menos 95%, o incluso por lo menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular mostrará no más de 10 diferencias en aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia en aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En aún otra modalidad, un anticuerpo desfucosilado de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD30 de la invención.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del

mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 1, 2 Y 3;

(b) la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 4, 5 Y 6; y

(c) el anticuerpo se une específicamente a CD30 humano.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga con las secuencias establecidas en lo anterior. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen alta homología (es decir, 80% o mayor) con las regiones V_H y V_L de las secuencias establecidas en lo anterior, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias SEC. DE IDENT. NOS: 1-6, seguido por la prueba por función retenida del anticuerpo alterado codificado (es decir, unión a CD30) utilizando los ensayos de unión descritos en la presente. Moléculas de ácidos nucleicos que codifican SEC. DE IDENT. NOS: 1-6 se muestran en SEC. DE

IDENT. NOS: 30-35.

Como se utiliza en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencia de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes en lo siguiente.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse utilizando un programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede también determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización de

longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden además utilizarse

188

como una "secuencia de consultas" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, calificación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineamientos espaciales para propósitos de comparación, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) pueden utilizarse. Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas modalidades, un anticuerpo desfucosilado de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos específicas con base en los anticuerpos preferidos descritos en la presente (por

ejemplo, 5F11, 17G1 y 2H9), o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD30 de la invención. En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 9, 12 ó 15, y modificaciones conservadoras de las mismas;

(b) la secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 18, 21 ó 24, y modificaciones conservadoras de las mismas; y

(c) el anticuerpo se une específicamente a CD30 humano.

En una modalidad preferida, la secuencia CDR2 de región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 8, 11 ó 14, y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia CDR2 de región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 17, 20 ó 23, y

modificaciones conservadoras de la misma. En otra modalidad preferida, la secuencia CDR1 de región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 7, 10 ó 13, y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia CDR1 de región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 16, 19 ó 22, y modificaciones conservadoras de la misma.

Como se utiliza en la presente, el término "modificaciones conservadoras de secuencia" pretende referirse a modificaciones en aminoácidos que no afectan o alteran de manera significativa las características de unión del anticuerpo que contienen la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo de la invención por técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son una en que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena latera similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por

ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). De esta manera, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención puede reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede probarse por función retenida (es decir, las funciones establecidas en (i) y hasta (iv) en lo anterior) utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Alternativamente, en otra modalidad, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-CD30, tal como por mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-CD30 modificados resultantes pueden tamizarse para actividad de unión.

Anticuerpos que se Unen al Mismo Epítopo como los Anticuerpos Anti-CD30 de la Invención

En otra modalidad, la invención proporciona

anticuerpos desfucosilados que se unen al mismo epítopo como lo hacen los diversos anticuerpos anti-CD30 de la invención proporcionados en la presente, tales como otros anticuerpos humanos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos 5F11, 17G1 o 2H9 descritos en la presente. Tales anticuerpos adicionales pueden identificarse con base en su capacidad de competencia cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención, tales como 5F11, 17G1 o 2H9, en ensayos de unión a CD30 estándar. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, 5F11, 17G1 o 2H9, a CD30 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con aquel anticuerpo para unirse a CD30 humano; de manera que un anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o una relacionado (por ejemplo, uno estructuralmente similar o espacialmente próximo) en CD30 humano como el anticuerpo con el cual compite. En una modalidad preferida, el anticuerpo desfucosilado que se une al mismo epítopo en CD30 humano como 5F11, 17G1 o 2H9 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en la Publicación de PCT WO 03/059282.

Anticuerpos Diseñados y Modificados

Un anticuerpo desfucosilado de la invención además puede prepararse utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en la presente como material de inicio para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de inicio. Un anticuerpo puede diseñarse al modificar uno o más residuos de aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de armazón. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse al modificar residuos dentro de la o las regiones constantes, por ejemplo para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de región variable que puede realizarse es injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones de determinación de complementaridad (CDRs) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más variadas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Ya que las secuencias CDR son los responsables de la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos que se presentan de manera natural al

construir vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico que se presenta de manera natural injertadas en secuencias de armazón de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Véase. U.S.A. 86:10029-10033; Patente Norteamericana No. 5,225,539 para Winter, y Patentes Norteamericanas Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen et al.).

En consecuencia, otra modalidad de la invención concierne a un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 7, 8 y 9, SEC. DE IDENT. NOS: 10, 11 y 12, y SEC. DE IDENT. NOS: 13, 14 y 15, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 16, 17 y 18, SEC. DE IDENT. NOS: 19, 20 y 21 y SEC. DE IDENT. NOS: 22, 23 y 24, respectivamente. De esta manera, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR V_H y V_L de anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1 o 2H9, aún pueden contener diferentes secuencias de armazón de estos

anticuerpos.

Tales secuencias de armazón pueden obtenerse de base de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins de Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire de Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory de Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada una de las cuales se incorporan expresamente en la presente para referencia.

Secuencias de armazón preferidas para utilizarse en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de armazón utilizadas por anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias V_H 4-34 o 3-07 (SEC. DE IDENT. NOS: 25 o 26, respectivamente) y/o la secuencia de

armazón V_K L15, A27 o L6 (SEC. DE IDENT. NOS: 27, 28 o 29, respectivamente) utilizadas por anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias 2 y 3 de V_H CDR1, y las secuencias 2 y 3 de V_K CDR1, pueden injertarse en regiones de armazón que tienen la secuencia idéntica como aquella que se encuentra en el gen de inmunoglobulina de línea germinal de la que se deriva la secuencia de armazón derive, o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones de armazón que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertas instancias es benéfico mutar residuos dentro de las regiones de armazón para mantener o intensificar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase por ejemplo, Patentes Norteamericanas Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen et al).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_K para mejorar por consecuencia una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la o las mutaciones y el efecto en la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede valuarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* según se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. Preferiblemente se introducen

modificaciones conservadoras (como se discute en lo anterior). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, pero de preferencia son sustituciones. Más aún, típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR alterada.

En consecuencia, en otra modalidad, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-CD30 desfucosilado, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región variable CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 7, 8 y 9, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 7, 8 y 9; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 10, 11 y 12, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 10, 11 y 12; (c) una región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO:

13, 14 y 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 13, 14 y 15; (d) una región CDR1 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 16, 17 y 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 16, 17 y 18; (e) una región CDR2 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 19, 20 y 21, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 19, 20 y 21; y (f) una región CDR3 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 22, 23 y 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 22, 23 y 24.

Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos que se han hecho modificaciones a los residuos de armazón dentro de V_H y/o V_K, por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones de armazón se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "restituir" uno o más residuos de armazón a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener residuos de armazón que difieren de la secuencia de línea germinal de la que el anticuerpo se deriva. Tales residuos pueden identificarse a comparar las secuencias de armazón del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de la que el anticuerpo se deriva. Por ejemplo, para 5F11, el residuo de aminoácido #83 (dentro de FR3) de V_H es una asparagina mientras que este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 4-34 correspondiente es una serina. Para regresar la secuencia de la región de armazón a la configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "restituirse" a la secuencia de línea germinal por, por ejemplo, mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, el residuo 83 de FR3 de la V_H de 5F11 puede "restituirse" de asparagina a serina. Tales anticuerpos "restituidos" pretenden también contemplarse por la invención.

Otro tipo de modificación de armazón involucra

mutar uno o más residuos dentro de la región de armazón, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopos de célula T para reducir por consecuencia la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta estrategia es también referida como "desinmunización" y se describe en mayor detalle en la Publicación de Patente Norteamericana No. 20030153043 por Carr et al.

Como adición o alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones de armazón o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media sérica, fijación del complemento, unión a receptor de Fc, y/o citotoxicidad dependiente de antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más porciones química pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, una vez más para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe en mayor detalle en lo siguiente. La numeración de residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat.

En una modalidad, la región de la bisagra de CHI se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región de la bisagra se altera, por ejemplo,

incrementándose o disminuyendo. Esta estrategia se describe además en la Patente Norteamericana No. 5,677,425 por Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región de la bisagra de CHI se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamble de las cadenas ligera y pesada o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra modalidad, la región de la bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones en aminoácidos se introducen en la región de interconexión del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de manera que el anticuerpo tiene unión impedida a la proteína A estafilococcica (SpA) con relación a la unión A-SpA de dominio Fc bisagra nativo. Esta estrategia se describe en mayor detalle en la Patente Norteamericana No. 6,165,745 por Ward et al.

En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para incrementar su vida media biológica. Diversas estrategias son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones puede introducirse: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente Norteamericana No. 6,277,375 para Ward. Alternativamente, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CHI o CL para que contenga un epítopo de unión a receptor silvestre tomado a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región

Fc de una IgG, como se describe en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,869,046 y 6,121,022 por Presta et al.

Aún en otras modalidades, la región Fc se altera al reemplazar por lo menos un residuo de aminoácidos con un residuo de aminoácidos diferente para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 puede reemplazarse con un residuo de aminoácidos diferente de manera que el anticuerpo tenga un afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector para el cual se altera la afinidad, puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente Cl del complemento. Esta estrategia se describe en mayor detalle en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter et al.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga unión alterada a Clq y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o suprimida. Esta estrategia se describe en mayor detalle en la Patente Norteamericana No. 6,194,551 por Idusogie et al.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran

para alterar por consecuencia la capacidad del anticuerpo para fijar complemento. Esa estrategia se describe en mayor detalle en la Publicación de PCT WO 94/29351 por Bodmer et al.

Aún en otro ejemplo, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ al modificar uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe además en la Publicación de PCT WO 00/42072 por Presta. Más aún, los sitios de unión en IgGl humana para FcγRl, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito por variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 demostraron mejorar la unión a FcγRIII. Adicionalmente, las siguientes mutantes de combinación mostraron mejorar la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

Otra modificación de los anticuerpos en la presente que se contempla por la invención es pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, incrementar la vida media biológica (por ejemplo, sérica) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster o aldehído reactivo derivado de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero análogo soluble en agua reactivo). Como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol" pretende contemplar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar las proteínas, tales como mono alcoxi (de 1 a 10 átomos de carbono) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se pegilará es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar la proteína se conocen en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura et al. y EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

Métodos para Diseñar Anticuerpos

Como se discutió en lo anterior, los anticuerpos anti-CD30 desfucosilados que tienen secuencias de V_H y V_K descritas en la presente pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos anti-CD30 al modificar la secuencias de VH y/o V_K, o la o las regiones constantes unidas a las mismas. De esta manera, en otro aspecto de la invención, las características estructuras de un anticuerpo anti-CD30 de la invención, por ejemplo 5F11, 17G1 y 2H9, se utilizan para crear anticuerpos anti-CD30 desfucosilados estructuralmente relacionados que retienen por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como unión a CD30 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 5F11, 17G1 y 2H9, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse de manera recombinantemente con regiones de armazón conocidas y/o otras CDRs para crear anticuerpos anti-CD30 diseñados de manera recombinante adicionales de la invención, como se discute en lo anterior. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de inicio para el método de diseño es una o más de las secuencias de V_H y/o V_K proporcionadas en la presente, o uno o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar de hecho (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de V_H y/o V_K proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Antes bien,

la información contenida en la o las secuencias se utiliza como el material de inicio para crear una o unas secuencias de "segunda generación" derivadas de la o las secuencias originales y entonces la o las secuencias de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

En consecuencia, en otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CD30 que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesa que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 7, 8 y 9, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 10, 11 y 12 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 13, 14 y 15; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 16, 17 y 18, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19, 20 y 21 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 22, 23 y 24;

(b) alterar por lo menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear por lo menos una

secuencia de anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Técnicas estándar en biología moléculas pueden utilizarse para preparar y expresar las secuencias de anticuerpo alteradas. La secuencia de anticuerpo alterada preparada así puede entonces elaborarse en forma desfucosilada utilizando los métodos descritos en la presente para obtener un anticuerpo anti-CD30 alterado desfucosilado.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden valorarse utilizando ensayos estándares disponibles en la técnica y/o descritos en la presente, tales como aquellos establecidos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión, ensayos de ADCC).

En ciertas modalidades de los métodos para diseñar anticuerpos de la invención, las mutaciones pueden introducirse aleatoria o selectivamente a lo largo de la totalidad o en una parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-CD30 y los anticuerpos anti-CD30 resultantes pueden tamizarse para actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Método mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la Publicación de PCT WO 02/092780 por Short describe método para crear y tamizar mutaciones de anticuerpo

utilizando mutagénesis por saturación, ensamble por ligación sintética o una combinación de las mismas. Alternativamente, la Publicación de PCT WO 03/074679 por Lazar et al. describe métodos de tamización computacionales para tamizar las propiedades fisioquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de Ácidos Nucleicos que Codifican Anticuerpos de la Invención

Otro aspecto de la invención concierne a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. El término "molécula de ácido nucleico", como se utiliza en la presente, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, pero de preferencia es ADN de doble hebra. Los ácidos nucleicos pueden presentarse en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aísla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica retirándose de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, gradientes CsCI, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols en Molecular Biology,

Greene Publishing and Wiley Enterscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o RNA y puede o no puede contener secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas en biología molecular estándar. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humanas como se describe adicionalmente en lo siguiente), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo elaborado por el hibridoma pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas (por ejemplo, utilizando técnica de presentación en fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son aquellas que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 5F11, 17G1 y 2H9. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 5F11 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 30. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 5F11 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 33. La secuencia de ADN que codifica la secuencia

VH de 17G1 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 31. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 17G1 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 34. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 2H9 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 32. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 2H9 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 35.

Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL se obtienen, estos fragmentos de ADN pueden además manipularse por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza de manera operativa a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", como se utiliza en este contexto, pretende dar a entender que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa al enlazar de manera operativa el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena

pesada (CHI, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., el al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que contemplan esas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero de mayor preferencia es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede enlazarse de manera operativa a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante de CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera Fab) al enlazarlo operativamente al ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins de Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que contemplan estas regiones pueden obtenerse por

amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero de mayor preferencia es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan operativamente a otro fragmento que codifican un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, de manera que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque con frecuencia en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), ya sea ADNc, genómico o mezclas pueden mutarse, de los mismo de acuerdo con técnicas estándar para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, las secuencias de ADN sustancialmente homólogas o derivadas de conmutaciones constantes de V, D, J, nativas y otras secuencias tales descritas en la presente se contemplan (donde "derivada" indica que una secuencia es idéntica o modificada a partir de otra secuencia).

Producción de Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención pueden producirse por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional por ejemplo, la técnica de hibridación celular somática estándar de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación celular somática, en principio, otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizador para fusión se conocen en la técnica. Progenitores de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión se conocen también.

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

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe

en lo anterior. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y diseñarse para contener secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas en biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden enlazarse a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 4,816,567 para Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un armazón humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5,225,539 para Winter, y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen et al.). Una diversidad de anticuerpos anti-CD30 de ratón se conocen en la técnica que pueden utilizarse para crear anticuerpos anti-CD30 quiméricos o humanizados, por ejemplo, AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, y Ber-H8.

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD30 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o ratones cromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano más que del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y

transcromosómicos incluyen ratones referidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se refieren de manera colectiva en la presente como "ratón de Ig humana".

El HuMAb mouse® (Medarex, Enc.) contiene miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humana sin ordenar, en conjunto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (véase por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humana experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar IgGκ monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Entern. Rev. Immunol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMab, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describen además en Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature

Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBOJ. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todas se incorporan específicamente por la presente para referencia en su totalidad. Véase además, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas para Lonberg y Kay; la Patente Norteamericana No. 5,545,807 para Surani et al.; las Publicaciones de PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas para Lonberg y Kay; y la Publicación de PCT No. WO 01/14424 para Korman et al.

En otra modalidad, los anticuerpos humanos de la invención pueden amplificarse utilizando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que lleva un transgen de cadena pesada humana y transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, referidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la Publicación de PCT WO 02/43478 para Ishida et al.

Adicionalmente incluso, sistemas animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana se encuentran disponibles en la técnica y pueden utilizarse para

amplificar anticuerpos anti-CD30 de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse (Abgenix, Enc.) puede utilizarse; tales ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 para Kucherlapati et al.

Más aún, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana se encuentran disponibles en la técnica y pueden utilizarse para amplificar anticuerpos anti-CD30 de la invención. Por ejemplo, los ratones que llevan un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana, referido como "ratón TC" puede utilizarse; tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Adicionalmente, vacas que llevan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y pueden utilizarse para amplificar anticuerpos anti-CD30 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando métodos de presentación en fagos para tamización de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica. Véase por ejemplo: las Patentes Norteamericanas Nos.

5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 para Ladner et al.; las Patentes Norteamericanas Nos. 5,427,908 y 5,580,717 para Dower et al.; las Patentes Norteamericanas Nos. 5,969,108 y 6,172,197 para McCafferty et al.; y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 para Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden también prepararse utilizando ratones SCID en los que células inmunes humanas se han reconstituido de manera que una respuesta de anticuerpos humanos puede generarse en la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,476,996 y 5,698,767 para Wilson et al.

Inmunización de Ratones de Ig Humana

Cuando ratones de Ig humana se utilizan para amplificar anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD30 y/o CD30 recombinante, o una proteína de fusión de CD30, como se describe por Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; y la Solicitud de PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, una preparación purificada o recombinante (5-50 µg)

de antígeno CD30 puede utilizarse para inmunizar los ratones de Ig humana de manera intraperitoneal.

Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para CD30 se describen en la Publicación PCT WO 03/059282. Experiencia acumulada con varios antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente de manera intraperitoneal (IP) con antígeno el adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, adyuvantes diferentes al de Freund también se encuentran efectivos. Además, células completas en ausencia de adyuvante se encuentran altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede monitorearse durante el curso de protocolo de inmunización con muestras plasmáticas obteniéndose por sangrados retroorbitales. El plasma puede tamizarse por ELISA (como se describe en lo siguiente), y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-CD30 pueden utilizarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse de manera intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y remoción del bazo. Se espera que 2-3 para cada inmunización se necesiten realizar. Entre 6 y 24 ratones se inmuniza típicamente para cada antígeno. Usualmente se utilizan las cepas HCo7 y HCo12. Además, los transgenes HCo7 y HCo12 pueden reproducirse juntos en un solo ratón que tiene

dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12).

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos de la Invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, esplenocitos y/o células de nódulo linfático de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden tamizarse para la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, suspensiones celulares sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden fusionarse a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50% PEG. Las células se colocan en placas a aproximadamente 2 x 10^5 en placas de microvaloración de fondo plano, seguida por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene 20% de Clone Serum fetal, 18% de medio condicionado "653", 5% de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1X (Sigma; el HAT se agrega 24 horas después de la fusión. Después de aproximadamente dos semanas,

las células pueden cultivarse en medio en el que el HAT se reemplaza con HT. Pozos individuales pueden entonces tamizarse por ELISA para anticuerpos IgM y IgG monoclonales humanos. Una vez que se presenta crecimiento extensivo del hibridoma, el medio puede observarse usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden recolocarse en placas, tamizarse otra vez, y si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por lo menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden entonces cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en el medio de cultivo del tejido para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces para agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluída puede verificarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse por PBS, y la concentración puede determinarse por OD280 utilizando un coeficiente de extensión de 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden guardarse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Generación de Transfectomas que Producen Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos de la invención pueden también reproducirse en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica bien conocidos (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADNs que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, pueden obtenerse por técnicas en biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADNs pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes se enlacen operativamente a secuencias de control transcripcional y transduccional. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende dar a entender que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y transduccional dentro del vector desempeñan su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de vector de expresión y secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de

anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementario en el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no se presentan sitios de restricción). Las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos descritos en la presente pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo al insertarlo en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento V_H se enlaza operativamente al o los segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_K se enlaza operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal se enlaza en marco de lectura al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los

vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia regulatoria" pretende incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped que se transformará, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Secuencias reguladoras preferidas para expresión en célula huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus 40 de Simio (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, secuencias reguladoras no virales pueden utilizarse, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β-globina. Incluso además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tal como el

sistema promotor SRα, que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y el repetido terminal largo del virus tipo 1 de la leucemia de células T humanas(Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Gell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores selectivos. El gen marcador selectivo facilita la selección de célula huésped en las que el vector se ha introducido (véase, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas para Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador selectivo confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que el vector se ha introducido. Genes marcadores selectivos preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para utilizarse en células huésped de dhfr- con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por técnicas estándar. Las diversas formas del término

"transfección" pretenden contemplar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con calcio-fosfato, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en célula huésped procariótica o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos en células eucarióticas, y de mayor preferencia en células huésped de mamífero, es la más preferida ya que tales células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procarióticas para ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. La expresión procariótica de genes de anticuerpo se ha reportado inefectiva para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Células huésped preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células que modifican la fucosilación de un anticuerpo expresado. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de manera que la célula huésped produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos, o una célula huésped que expresa glicosil transferasas que modifican glicoproteínas de manera que los anticuerpos

expresados en la célula huésped tienen estructuras incrementadas GlcNac divididas que evitan la fucosilación. Otras células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen las de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador selectivo DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para utilizarse con células de mieloma NS0, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando os vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen al cultivar las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultiva la célula huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas estándar.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un

anticuerpo anti-CD30 desfucosilado, o un fragmento del mismo, conjugado a una porción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se refieren en la presente como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se refieren como "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo, mata) las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismo. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina

(anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado caliqueamicina anticuerpo se encuentra comercialmente disponible (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citocinas pueden conjugarse a los anticuerpos de la invención utilizando tecnología de enlazador disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazador que se han utilizado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptido. Un enlazador puede elegirse para que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por bajo pH dentro del compartimiento lisosomal o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas de preferencia en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para una discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. et al.

(2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Envestig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) Adv. DrugDeliv. Rev. 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse a un isótopo radiactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, referidos también como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse a anticuerpos para utilizarse de manera diagnóstica o terapéutica incluyen, pero no se limitan a, yodo^{131}, indio^{111}, itrio^{90} y lutecio^{177}. El método para preparar radioinmunoconjugados se establece en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados se encuentran comercialmente disponibles, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y métodos similares pueden utilizarse para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y la porción del fármaco no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos típicos clásicos. Por ejemplo, la porción del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales

proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoncinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos, u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tal porción terapéutica a anticuerpos se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies Y Cancer Therapy, Reisfeld *et al. (eds.)*, pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al. (eds.)*, pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological Y Clinical Applications, Pinchera *et al. (eds.)*, pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, Y Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection Y Therapy, Baldwin *et al. (eds.)*, pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et*

al., "The Preparation Y Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una o unas porciones de unión-antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, do o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (inmunoconjugados) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividad complementaria.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación pueden incluir un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado de la presente invención combinado con por lo menos otro agente anti-neoplásico, anti-inflamatorio, o inmunosupresor. Tales agentes terapéuticos incluyen entre otros, fármacos anti-inflamatorios esteroidales y no esteroidales (NSAIDS), por ejemplo, aspirina y otros

salicilatos, tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), naproxeno (Naprosyn), sulindaco (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), cetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolaco (Lodine), oxaprozin (Daypro), indometacina (Indocin), y aspirina en altas dosis. Otros ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en terapia de combinación se describen en mayor detalle en lo siguiente, en la sección de usos de los anticuerpos de la invención.

Como se utiliza en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifungales, agentes de retardamiento isotónicos y de absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. De preferencia, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración el compuesto activo, es decir, anticuerpo o inmunoconjugado, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que

retiene la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no imparte ningunos efectos toxicológicos indeseados (véase por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodihídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos, sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básica incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenziltilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición farmacéutica de la invención puede también incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidamente solubles en aceite, tales como palmitato de

ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino tetra-acético, (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

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

Estas composiciones pueden también contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse por procedimientos de esterilización, *supra*, y por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifungales, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, y similares. Puede también ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y

similares de las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectable estéril. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto a tal lado que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención se contemplan. Compuestos activos suplementarios pueden también incorporarse en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración del fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula

requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, poli-alcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada en la composición inyectable puede realizarse al incluir en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Soluciones inyectables estériles pueden prepararse al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo anterior, como se requiera, seguido por microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados en lo anterior. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son, secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada estéril de los mismos.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola

forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se trata,, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola forma de dosificación generalmente será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, fuera del cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.01 a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, de preferencia de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, de mayor preferencia de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un solo bolo puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse durante el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración, y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente dispuestas, adecuadas como dosificaciones unitarias para os

sujetos que se tratarán; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención se dicta por y depende por (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se logrará, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hueso. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ó 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses y una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal ó 3 mg/kg de peso corporal vía administración intravenosa, con el anticuerpo que se da utilizando uno de los siguientes calendarios de

dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo usualmente se administra en ocasiones múltiples. Los intervalos entre dosificaciones sencillas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares como se indica al medir niveles de sangre del anticuerpo para el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración plasmática de anticuerpo de aproximadamente 1-1000 μg /ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 μg /ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no

humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo si el tratamiento el profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere algunas veces hasta que el progreso de la enfermedad se reduzca o se termine, y de preferencia hasta que el paciente muestre mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. En lo sucesivo, el paciente puede administrarse por un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación actuales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse, de manera que se obtenga una cantidad de ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para una paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una serie de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal, o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del

compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-CD30 de la invención de preferencia resulta en una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro y discapacidad debidos a la aflicción de la enfermedad.. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores cancerosos, una "dosificación terapéuticamente efectiva" de preferencia inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral en por lo menos aproximadamente 20%, de más preferencia por lo menos aproximadamente 40%, aun de más preferencia por lo menos aproximadamente 60%, y aún de más preferencia por lo menos aproximadamente 80% con relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esa propiedad de una composición puede evaluarse al examinar la capacidad del compuesto para inhibir, la inhibición *in vitro* por ensayos conocidos para el

profesional experto. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otra manera mejorar los síntomas en un sujeto. Alguien con experiencia ordinaria en la técnica debe ser capaz de determinar tales cantidades con base en factores tales como la talla del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición de o ruta de administración particular seleccionadas.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una o más rutas de administración utilizando uno o más de una serie de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el técnico experto, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferidas de administración para los anticuerpos de la invención incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en la presente significa modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye sin limitación inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular,

subaracnoidea, intraespinal, epidural e inyección intraesternal e infusión.

Alternativamente, un anticuerpo desfucosilado de la invención puede administrarse mediante una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópicamente.

Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Polímeros biodegradables biocompatibles pueden utilizarse, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones se patentan o en general se conocen por aquellos con experiencia en la técnica. *Véase*, por ejemplo, Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica, por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los

dispositivos descritos en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; ó 4,596,556. Ejemplos de implantes y modelos bien conocidos útiles en la presente incluyen: Patente Norteamericana No. 4,487,603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para distribuir médicamente a una velocidad controlada; Patente Norteamericana No. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente Norteamericana No. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar médicamente a una velocidad de infusión precisa; Patente Norteamericana No. 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármaco; Patente Norteamericana No. 4,439,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de cámara múltiple; y Patente Norteamericana No. 4,475,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico. Estas patentes se incorporan en la presente para referencia. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos se conocen por aquellos con experiencia en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos desfucosilados de la invención pueden formularse para asegurar distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos

altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), puedan formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, de esta manera intensifican el suministro de fármaco dirigido (*véase,* por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. *Clin. Pharmacol.* 29:685). Opciones de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Patente Norteamericana 5,416,016 para Low *et al.); manósidos* (Umezawa *et al.,* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBSLett.* 357:140;. M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptores de proteína A tensioactiva (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBSLett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y Métodos de la Invención

Los anticuerpos desfucosilados, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e

in vivo involucrando el diagnóstico y tratamiento de trastornos que involucran la expresión de CD30. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y para diagnosticar una diversidad de trastornos. Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, pollos, aves, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos asociados con la expresión de CD30. Cuando los anticuerpos para CD30 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en orden o de manera simultánea.

Rutas adecuadas para la administración de las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo o inmunoconjugado) de la invención *in vivo e in vitro* se conocen bien en la técnica y pueden seleccionarse por aquellos con experiencia ordinaria. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden probarse inicialmente para actividad de unión asociada con uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden probarse utilizando ensayos de ELISA y citometría de flujo. Además, la actividad de estas moléculas en el inicio de por lo menos una actividad de célula efectora mediada por efector incluyendo la inhibición del crecimiento de y/o eliminación de células que expresan PSM pueden ensayarse. Protocolos para ensayar la ADCC mediada por célula efectora se describen en los Ejemplos a continuación.

A. Métodos de Detección

En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para detectar niveles de CD30, o niveles de células que contienen CD30 en su superficie membranal, cuyos niveles pueden entonces asociarse con ciertos síntomas de enfermedad.

En una modalidad particular, la invención proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno CD30 en una muestra, o mediar la cantidad de antígeno CD30, que comprende contactar la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo desfucosilado, o una porción de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a CD30, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el

anticuerpo o porción del mismo y CD30. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra control es indicativo de la presencia de antígeno CD30 en la muestra. Por ejemplo, métodos de detección estándar, bien conocidos en la técnica, tales como ensayos de ELISA y citometría de flujo pueden realizarse utilizando las composiciones de la invención.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención además proporciona métodos para detectar la presencia de CD30 (por ejemplo, antígeno CD30 humano) en una muestra, o medir la cantidad de CD30, que comprende contactar la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo de la invención, o una porción de unión de antígeno del mismo, que se une específicamente a CD30, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y CD30. La formación de un complejo entonces se detecta, en donde la diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra control es indicativo de la presencia de CD30 en la muestra.

Las composiciones de la invención pueden también utilizarse para dirigirse a células que expresan CD30, por ejemplo, para etiquetar tales células. Para tal uso, el agente de unión puede enlazarse a una molécula que pueda detectarse. De esta manera, la invención proporciona métodos

para localizar células que expresan CD30 *ex vivo* o *in vitro*. La etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, a radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

B. Inhibición de Crecimiento de Células CD30+

Los anticuerpos pueden utilizarse para inhibir o bloquear la función de CD30 la cual, a su vez, puede asociarse a la prevención o mejoría de ciertos síntomas de enfermedad, implicando por consiguiente a CD30 como involucrado en la enfermedad. Diferencias en la expresión de CD30 durante una condición de enfermedad en comparación con una condición de no enfermedad pueden determinarse al contactar una muestra de prueba de un sujeto que adolece de la enfermedad y una muestra control con el anticuerpo anti-CD30 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD30. Cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo y CD30 se detectan y comparan en la muestra y el control.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse para obtener, *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: para inhibir el crecimiento de y/o eliminar una célula que expresa CD30; para mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CD30 en la presencia de células efectoras humanas; para inhibir la

secreción de CD30 soluble, para bloquear la unión del ligando de CD30 a CD30, para inhibir la expresión de IL-4 o para mediar la expresión del fenotipo Th2, por ejemplo, a bajas dosificaciones. Como se discute en la presente, los anticuerpos desfucosilados de la invención exhiben actividad ADCC intensificada en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células $CD30^+$ que comprende contactar las celdas con un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

En una modalidad, los anticuerpos, o porciones de unión de los mismos de la presente invención pueden utilizarse para modular niveles de CD30 en las células objetivo, tal como por bloqueo y eliminación de receptores en la superficie celular. Mezclas de anticuerpos anti-receptor de Fc pueden también utilizarse para este propósito.

Células efectoras específicas de objetivo, por ejemplo, células efectoras enlazadas a composiciones de la invención pueden también utilizarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras pueden ser leucocitos

humanos, tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células que llevan receptor IgG- o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto que se tratará. Las células efectoras específicas de objetivo, pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administrado puede estar en el orden de 10^8-10^9 pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener localización en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CD30, y para efectuar la eliminación de la célula por, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración pueden variar también.

La terapia con células efectoras específicas de objetivo puede realizarse en conjunto con otras técnicas para la remoción de células objetivo. Por ejemplo, terapia anti-tumoral utilizando las composiciones de la invención y/o células efectoras armadas con esas composiciones pueden utilizarse en conjunto con la quimioterapia. Adicionalmente, inmunoterapia de combinación puede utilizarse para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de la célula tumoral.

C. Uso de Inmunoconjugados y Terapia de Combinación

En una modalidad, los inmunoconjugados de la invención pueden utilizarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, etiquetas, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular de CD30 al enlazar tales compuestos al anticuerpo. De esta manera, la invención también proporciona métodos para localizar células que expresan CD30 *ex vivo* o *in vitro* (por ejemplo, con una etiqueta detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados pueden utilizarse para eliminar células que tienen receptores de superficie celular de CD30 al dirigir citotoxinas o radiotoxinas a CD30, tal como a células tumorales que expresan CD30 para eliminar por consiguiente la célula tumoral, o a células presentadoras de antígeno que expresan CD30 para eliminar por consiguiente las APC como un medio para inhibir respuestas inmunes (por ejemplo, en trastornos autoinmunes).

En otras modalidades, el sujeto puede adicionalmente tratarse con un agente que modula, por ejemplo, intensifica o inhibe, la expresión de la actividad de Fcγ o receptores de Fcγ, por ejemplo, al tratar al sujeto con una citocina. Citocinas preferidas para la administración durante el tratamiento incluyen del factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de

colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral.

En otra modalidad, el sujeto puede adicionalmente tratarse con una preparación de linfocinas. Las células cancerosas que no expresan altamente CD30 pueden inducirse a hacerlo utilizando preparaciones de linfocinas. Las preparaciones de linfocinas pueden provocar una expresión más homogénea de CD30 entre las células de un tumor lo que puede conducir a una terapia más efectiva. Las preparaciones de linfocinas adecuadas para la administración incluyen interferón gama, factor de necrosis tumoral y combinaciones de los mismos. Estos pueden administrarse de manera intravenosa. Dosificaciones adecuadas de linfocina son 10,000 a 1,000,000 de unidades/paciente.

En otra modalidad, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden adicionalmente administrarse (previo a, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que intensifica o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos. El anticuerpo puede enlazarse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el ultimo caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o de manera concurrente con el agente o puede

coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti,-cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales como doxorubicina, (adriamicina), sulfato de cisplatina bleomicina, carmustina, clorambucil y ciclofosfamida hidroxiurea que, por sí mismos, sólo son efectivos a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. La cisplatina se administra de manera intravenosa como una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la diamicina se administra de manera intravenosa como una dosis a 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos anti-CD30, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporcionan dos agentes anti-cancerosos que operan mediante mecanismos diferentes lo cual produce un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Tal coadministración puede resolver problemas debidos a desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que podría volverlas no reactivas con el anticuerpo.

D. Tratamiento de Enfermedades Autoinmunes

Las composiciones pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo* para tratar enfermedades mediadas por o que involucran CD30, por ejemplo, enfermedades caracterizadas por expresión,

típicamente sobreexpresión, de CD30, tales como enfermedades autoinmunes mediadas por macrófagos, neutrófilos activados, células dendríticas o células NK, tales como rechazo a trasplantes, o Enfermedad Injerto versus Huésped (GVHD). El CD30 soluble se secreta regularmente de la superficie de células que expresan CD30 y niveles elevados de CD30s se han reportado en el suero de pacientes con una diversidad de trastornos tumorigénicos y autoinmunes. En consecuencia, aún otro uso para los anticuerpos de la invención incluye la prevención o tratamiento de enfermedades involucrando bloqueo o inhibición de la secreción de CD30s.

Al contactar el anticuerpo con CD30 (por ejemplo, al administrar el anticuerpo a un sujeto), la capacidad de CD30 para inducir tales actividades se inhibe y, de esta manera, el trastorno asociado se trata. La composición de anticuerpos puede administrase sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un inmunosupresor que actúa en conjunto con o sinergísticamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad mediada por CD30. Los anticuerpos preferidos se unen a epítopos que son específicos para CD30 y, de esta manera, inhiben de manera ventajosa las actividades inducidas por CD30, pero no interfieren con la actividad de antígenos de superficie estructuralmente relacionados. Las composiciones pueden utilizarse para tratar cualesquiera enfermedades mediadas por células que expresan

CD30, incluyendo, pero sin limitarse a, anemia hemolítica autoinmune (AIHA), artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), Esclerosis Sistémica, Dermatitis Atópica, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegner, síndrome de Omen, falla renal crónica, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), síndrome de inflamación del intestino (IBD; incluyendo Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerativa y Enfermedad de Celiac), diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), mononucleosis infecciosa aguda, HIV, enfermedades asociadas con herpes virus, esclerosis múltiple (MS), anemia hemolítica, tiroiditis, síndrome de la persona rígida, pénfigo vulgar y miastenia grave (MG).

E. Tratamiento de Cáncer

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales CD30+ (es decir, células tumorales que expresan CD30) en un sujeto, en que un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado de la invención se administra al sujeto de manera que el crecimiento de la células tumorales CD30+ se inhibe. Para sujetos humanos, el anticuerpo es de preferencia anticuerpo humanizado o humano. En una modalidad preferida, las células tumorales son células tumorales de Enfermedad de Hodgkin. En otra modalidad preferida, las células tumorales

son células tumorales de linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL). En otras modalidades, las células tumorales pueden ser de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfomas cutáneos de células T, linfomas de célula hendida pequeña nodular, linfomas linfocíticos, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T del adulto (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas de célula grande difusa de linaje B, linfoma de células T tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfoma de células T del adulto (ATL), linfomas basados en cavidad corporal asociados con HIV, Carcinomas Embrionarios, carcinomas desdiferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, Sarcoma de Kaposi y otros linfomas de células T CD30+ y linfomas de células B CD30+.

El método involucra administrar a un sujeto una composición de anticuerpos de la presente invención en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpos puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o uno radiotóxico que actúa en conjunto con o sinergísticamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la

enfermedad asociada con la expresión de CD30.

Equipos

También dentro del alcance de la invención se encuentran equipos que comprenden un anticuerpo de la invención e instrucciones para uso. El equipo puede además comprender uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunoestimulador, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se une a un epítopo en el antígeno CD30 distinto del primer anticuerpo). Los equipos típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del equipo. El término etiqueta incluye cualquier escritura, o material registrado suministrado en o con el equipo, o que de otra manera acompaña al equipo.

La presente invención además se ilustra por los siguientes ejemplos que no deben interpretarse además como limitantes. Los contenidos de todas las figuras y todas las referencias, patentes, y solicitudes de patente publicadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente para referencia.

Ejemplo 1 : Preparación y Caracterización de Anticuerpo Monoclonal Anti-CD30 Desfucosilado

En este ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD30 completamente humano se expresó en una línea celular que carece de una enzima fucosil transferasa de manera que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos. El anticuerpo desfucosilado se probó contra un anticuerpo anti-CD30 fucosilado (expresado en una línea celular diferente que contiene la enzima fucosil transferasa) para determinar diferencias estructurales y en características entre los anticuerpos, utilizando una diversidad de técnicas de análisis clínicos, incluyendo electroforesis capilar, comparación de secuencia de aminoácido, diferencias de masas por espectroscopia de masas y variación de carga por enfoque isoeléctrico capilar.

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

se subclonó en marco de lectura con la región constante pesada γ1 humana. Las expresiones de cadena ligera y pesada se dirigieron por los promotores C de ubiquitina humana (Nenoi, M. et al. Gene 175:179, 1996). Este vector de expresión se describe en mayor detalle en la Solicitud de Patente Norteamericana No. de Serie 60/500,803, los contenidos de la cual se incorporan expresamente en la presente para referencia.

El vector de expresión se transfectó en la línea Ms704 de células huésped $FUT8^{-/-}$ por electroporación de ADN. La línea celular Ms704 $FUT8^{-/-}$ se creó por la interrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo, y se describe más completamente en la Publicación de Patente Norteamericana 20040110704 por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22. Las células Ms704 se adaptaron al crecimiento en cultivo de suspensión en el medio de cultivo EX-CELL™ 325 PF CHO (JRH #14335) suplementado con hipoxantina 100 μM con timidina 16 μM (Invitrogen #11067-030) y L-glutamina 6 mM (Invitrogen #25030-081).

El ADN vector utilizado para incorporación se precipitó con etanol y se resuspendió en Tris 7.6 10 mM, EDTA 1 mM. 1, 5, 10, 15 o 20 μg de ADN se utilizaron para veinte electroporaciones, cuatro electroporaciones por concentración de ADN. Las células Ms704 se prepararon para la transfección

al lavar las células en una solución tamponada de sacarosa (SBS) y resuspender las células a 1 X 10^7 células/ml en solución SBS. 400 µl de célula se mezclaron con el ADN de la construcción y se electroporaron utilizando ajustes a 230 voltios, 400 microfaradays de capacitancia y 13 ohms de resistencia (electromanipulador celular BTX Molecular Delivery Systems #630). Las células se eliminaron de las celdillas de electroporación y se agregaron 20 ml de medio de cultivo. Las células se colocaron en placas en una placa de 96 pozos utilizando 200 µl de células por pozo, aproximadamente 4 X 10^4 células/pozo. 2 días después de la electroporación, 150 µl de medio se eliminaron de cada pozo y se reemplazaron con 150 µl de medio de selección, medio de cultivo con 400 µg/ml de G418 (Invitrogen #10131-035). Cada tres a siete días, 150 µl de medio de selección por pozo se reemplazaron con medio de selección fresco. Células huésped CHO DG44 (FUT 8 +/+) se electroporaron con la construcción 5F11 idéntica utilizando un procedimiento similar y las CHO DG44 transfectantes expresando anticuerpo 5F11 recombinante que contiene carbohidratos fucosilados se establecieron.

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

Análisis comparativo de muestras de oligosacáridos

enlazados a N derivados de Ms704 y el anticuerpo monoclonal anti-CD30 derivado de CHO DG44 se realizó por fluorescencia inducida por láser en electroforesis capilar (cLIF) (Chen y Evangelista (1998) *Electrophoresis* 15:1892). Los oligosacáridos enlazados a N del anticuerpo purificado se liberaron al agregar la péptido N-glicanasa (Prozyme) e incubaron durante la noche. La proteína se precipitó con etanol, y el sobrenadante que contenía carbohidrato se transfirió a un nuevo tubo y se secó utilizando un Speedvac. Los carbohidratos se resuspendieron y derivaron con 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonato (APTS) bajo condiciones suaves de aminación reductiva en las que la desialización y pérdida de residuos de fucosa se minimizaron. Los aductos de reacción se analizaron por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducida por láser (Beckman Coulter) (Ma y Nashabeh (1999) *Anal. Checo.* 71:5185). Diferencias en el perfil de oligosacáridos se observaron entre el anticuerpo obtenido a partir de la línea celular Ms704 en comparación la línea celular CHO DG44, consistentes con una ausencia de residuos de fucosa en los anticuerpos anti-CD30 derivados de Ms704.

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

Tabla 1: Análisis de Monosacáridos

Anticuerpo	Cantidad de Proteína (µg)	Monosacárido	Cantidad hallada (pmol)	mol Azúcar/mol Proteína
Anti-CD30 + fucosa	29 µg	Fucosa	206.0	1.0
		Galactosamina	0.0	0.0
		Glucosamina	847.6	4.4
		Galactosa	85.8	0.5
		Manosa	547.0	2.9
Anti-CD30 - fucosa	23 µg	Fucosa	0.0	0.0
		Galactosamina	0.0	0.0
		Glucosamina	655.2	4.3
		Galactosa	89.7	0.6
		Manosa	488.8	3.2

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

Fuera de la diferencia en oligosacáridos mostrada por electroforesis capilar y análisis de monosacáridos, las muestras de proteína de anticuerpo anti-CD30 derivadas de Ms704 y CHO DG44 fueron esencialmente idénticas. Análisis de secuencia de proteína N terminal reveló una secuencia e aminoácidos N terminal idéntica. Espectrometría de masas de la cadena ligera de los anticuerpos anti-PSM derivados de Ms704 y CHO DG44 produjeron masas de 23,740 y 23,742, respectivamente, que estuvieron dentro del error del instrumento. Los anticuerpos se probaron también utilizando un equipo de enfoque isoeléctrico capilar estándar (Beckman

Coulter) y mostraron que las dos muestras de anticuerpos tenían un punto isoeléctrico idéntico en 8.6. Estos estudios indican que el componente de proteína de las muestras de anticuerpo derivados de las células Ms704 y las CHO DG44 son esencialmente idénticas con la excepción de la desfucosilación del componente de carbohidrato de los anticuerpos derivados de Ms704

Ejemplo 2: Valoración de Actividad ADCC del Anticuerpo Anti-CD30 Desfucosilado

El anticuerpo 5F11 monoclonal anti-CD30 es capaz de eliminar células CD30+ a través del reclutamiento de una población de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En este ejemplo, anticuerpos monoclonales 5F11 desfucosilados (desfuc-5F11) se probaron por la capacidad para eliminar líneas celulares CD30+ en la presencia de células efectoras en un ensayo de liberación de cromo por toxicidad.

Células efectoras humanas se prepararon de sangre completa como sigue. Células mononucleares de sangre periférica humana se purificaron de sangre completa heparinizada por separación en Ficoll-paque estándar. Las células se resuspendieron en medio RPMI1640 que contiene 10% de FBS y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las células se recolectaron y lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a 1 x

10^7 células/ml. Dos millones de células CD30+ objetivo se incubaron con 200 μCi de ^{51}Cr en 1 ml de volumen total durante 1 hora a 37° C. Las células objetivo se lavaron una vez, se resuspendieron en 1ml de medio, y se incubaron a 37° C durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación final, las células objetivo se lavaron una vez y se llevaron a un volumen final de $1x10^5$ células/ml.

Las líneas celulares CD30+ L540 (linfoma de Hodgkin humano; Depósito DSMZ No. ACC 72), L428 (linfoma de Hodgkin humano; Depósito DSMZ No. ACC 197), L1236 (linfoma de Hodgkin humano; Depósito DSMZ No. ACC 530) y Karpas (linfoma de células T humano; Depósito DSMZ No. ACC 31) líneas celulares se probaron inicialmente por unión a el 5F11 fucosilado (fuc-5F11) y desfuc-5F11 utilizando un análisis de FACS estándar. Cada célula objetivo desplegó perfiles de unión similares a través de un intervalo de concentraciones de anticuerpo para fuc-5F11 y desfuc-5F11. El nivel de expresión de CD30, según se determina por intensidad de fluorescencia media, fue más alto en L540, seguida por Karpas, L428, y la expresión más baja de CD30 fue en células L1236.

Las células L540, L428, L1236 y Karpas se probaron en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por ^{51}Cr modificado como sigue. Cada línea celular objetivo (100 µl de células CD30+ etiquetadas) se incubó con 50 μl de células efectoras y 50 μl de anticuerpo.

Una proporción objetivo a efectora de 1:50 se utilizó en todo el experimento. En todos los estudios, los siguientes controles negativos se corrieron también: a) células objetivo y efectoras sin anticuerpo, b) células objetivo sin células efectoras, c) pozos que contienen células objetivo y efectoras en la presencia de 1% de Triton X-100, y d) control de isotipo de IgG1 humana. Después de una incubación de 4 horas a 37° C, los sobrenadantes se recolectaron y se contaron en un Contador gamma (Cobra II auto-gamma de Packard Instruments) con una ventana de lectura de 240-400 keV. Los conteos por minuto se graficaron como una función de concentración de anticuerpo y los datos se analizaron por regresión no lineal, respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) utilizando el software Prism (San Diego, CA). Curvas de citotoxicidad celular para las líneas celulares L540, L428, L1236 y Karpas utilizando concentraciones variables de fuc-5F11 y desfuc-5F11 se muestran en las Figuras 4-7, respectivamente.

El porcentaje de lisis se determinó por la siguiente ecuación:

% de Lisis = (CPM de Muestra- CPM sin anticuerpo)/CPM de TritonX-CPM Sin anticuerpo) X 100

El % de Lisis se probó a una concentración de anticuerpo de 25 µg/ml y una proporción célula objetivo a efectora de 1:50. Valores de EC_{50} también se calcularon para

cada célula objetivo. Los resultados se resumen en la Tabla 2 en lo siguiente.

Tabla 2: Capacidad Citotóxica del Anticuerpo Monoclonal Anti-CD30 Desfucosilado

Célula objetivo	% de Lisis	% de Lisis	% de Lisis proporción fucosa - :fucosa +	EC_{50} (µg/ml)	EC_{50} (µg/ml)	EC_{50} proporción fucosa+:fucosa-
	Fucosa +	Fucosa -		Fucosa +	Fucosa -	
L540	42	68	1.61	0.042	0.009	4.7
Karpas	19	50	2.63	0.250	0.032	7.8
L428	20	43	2.15	0.100	0.009	11.1
L1236	4	13	3.25	1.218	0.045	27.1

Desfuc-5F11 mostró de 1.61 veces (para células L540) a 3.25 veces (para células L1236) mayor porcentaje de lisis celular en comparación con el anticuerpo fuc-5F11. Esta potencia incrementada del desfuc-5F11 resulta en lisis celular medible a concentraciones de anticuerpo donde el fuc-5F11 no tiene efecto medible. Por ejemplo, en células L1236, que tienen un bajo nivel de expresión de CD30, desfuc-5F11 a 0.1 µg/ml resulta en un 10% de lisis específica, mientras que fuc-5F11 a la misma concentración no tiene efecto medible (véase Figura 6). Desfuc-5F11 fue 4.7 veces (para células L540) a 27.1 veces (para células L1236) más potente en actividad ADCC que el anticuerpo fuc-5F11, al medirse por proporción de valores de EC_{50}.

Ejemplo 3: Valoración de Actividad ADCC del Anticuerpo Anti-CD30

En este ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD30 se probaron por la capacidad para eliminar líneas celulares CD30+ en la presencia de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en un ensayo de citotoxicidad de fluorescencia. Células efectoras humanas se prepararon como se describe en lo anterior y el ensayo de ADCC realizado según se indica en lo anterior. Como puede verse en la Figura 9, cuando se utiliza el anticuerpo anti-CD30 desfucosilado hubo actividad ADCC incrementada en comparación con el anticuerpo anti-CD30 progenitor. Además, el anticuerpo anti-CD30 desfucosilado fue más potente que el anticuerpo progenitor lo que se pone en evidencia por la EC_{50} reducida en comparación con el anticuerpo anti-CD30 progenitor. El anticuerpo fue también más eficaz lo que se pone en evidencia por el hecho de que el máximo porcentaje lisis fue más alto para el anticuerpo anti-CD30 desfucosilado. Con cualquier anticuerpo, el anticuerpo anti-CD16 (3G8) efectivamente inhibió la ADCC lo que sugiere que esta lisis se medió por CD16.

Ejemplo 4: ADCC Incrementada con Células Efectoras Humanas

Ensayos de ADCC se realizaron como se describe en

lo anterior. En este experimento, sin embargo, células efectoras de ratón se compararon con células efectoras humanas. Como puede verse en la Figura 10, mientras no hubo ADCC incrementada al comparar el anticuerpo anti-CD30 progenitor con el anticuerpo desfucosilado cuando las células efectoras de ratón se utilizaron, cuando células efectoras humanas se examinaron, hubo un incremento notable en ADCC con el anticuerpo desfucosilado en comparación con el anticuerpo anti-CD30 progenitor.

Ejemplo 5: ensayo de ADCC comparando anticuerpo progenitor y desfucosilado utilizando células efectoras de macacos

Se obtuvo sangre completa de macacos. Células de sangre periférica de macaco con eritrocitos lisados se estimularon con 50 U/ml rIL-2 y se cultivaron en medio RPMI1640 que contiene 10% de FBS durante la noche a 37°C. En el día del estudio, las células de macaco se resuspendieron en tampón de ensayo (RPMI1640, 10% de FBS, probenecid 2.5 mM) a $1x10^7$ células/mL. Células objetivo positivas a CD30, Karpas 299, se etiquetaron, se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, probenecid 2.5mM, HEPES 20mM), y se ajustaron a $1x10^5$ células/mL para proporción célula objetivo a efectora 1:50. El ensayo de ADCC se realizó como se describe en lo anterior. Se comparó la actividad del anticuerpo anti-CD30

progenitor al anticuerpo desfucosilado utilizando células efectoras purificadas de sangre de macaco. Actividad modesta ADCC se observó con el anticuerpo progenitor (de aproximadamente 7-10% de lisis celular a 10 µg/mL). En contraste, el anticuerpo desfucosilado indujo porcentaje de lisis significativamente más alto (de aproximadamente 10-30% de lisis celular a 10 µg/mL) y una EC_{50} reducida(véase Figura 11).

Ejemplo 6: análisis de Scatchard de afinidad de unión de anticuerpos monoclonales anti-CD30 a células L540, células activadas de sangre periférica humana y de macaco

Se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD30 progenitor y desfucosilado. Se comparó la afinidad de unión de los dos anticuerpos a células L540 positivas a CD30 así como también células mononucleares de sangre periférica humana y de macaco activadas con PHA/Con A.

/*/*/*Células de sangre periférica humana o de macaco se estimularon con 2µg/ml de PHA, 10 µg/ml de Con A, y 50 U/ml de rIL-2 y se cultivaron en medio RPMI1640 que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) a $1x10^6$ células/ml de densidad durante 3 días. En el día del estudio, las células se lavaron y se ajustaron a $2x10^7$ células/ml en tampón de unión (RPMI1640 +10% de FBS). Como un control, células L540 positivas a CD30 (ajustadas a $4-8x10^6$

células/ml) se utilizaron en estos estudios ya que expresan altos niveles del antígeno. Las células se colocaron en hielo hasta el inicio del experimento. Placas de filtro de fibra de vidrio Millipore (MAFBNOB50) se recubrieron con 1% de leche en polvo descremada en agua y se almacenaron a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con 0.2 ml de tampón de unión. Cincuenta microlitros de tampón solo se agregaron a los pozos de unión máxima (unión total). Veinticinco microlitros de tampón solo se agregó a los pozos control. Concentración variable de anticuerpo ^{125}I-anti-CD30 se agregó a todos los pozos en un volumen de 25 μl. Concentraciones variables de anticuerpo no marcado en 300-400 veces en exceso se agregaron en un volumen de 25 μl a pozos control (unión inespecífica) y 25 μl de células L540 positivas a CD30 o células estimuladas de sangre periférica humana o de macaco en tampón de unión se agregaron a todos los pozos. Las placas se incubaron durante 2 horas a 200 RPM en un agitador a 4°C. Al completar la incubación las placas Millipore se lavaron dos veces con 0.2 ml de tampón de lavado frío (RPMI1640, 10% de FBS, NaCl 500 mM). Los filtros se eliminaron y contaron en un contador gamma. La evaluación de la unión de equilibrio se realizó utilizando parámetros de unión de un solo sitio con el software Prism (San Diego, CA).

Utilizando el ensayo de unión Scatchard anterior, la K_D del anticuerpo CD30 progenitor para células L540 fue

aproximadamente 1.4 nM mientras el anticuerpo desfucosilado tuvo una K_D de 1.9 nM (Tabla 3). Esto indica que hubo poco cambio en afinidad con remoción de fucosa. Estos estudios se repitieron utilizando células primarias más que una línea celular. Además, se probó la afinidad en células que expresan significativamente menos receptores por célula. Células activadas de sangre periférica humana se prepararon según se indica en lo anterior y la K_D se encontró ser 1.1 y 2.7 nM para anticuerpo anti-CD30 progenitor y desfucosilado, respectivamente.

Finalmente, se comparó la afinidad de unión del anticuerpo progenitor y desfucosilado para células mononucleares de sangre periférica de macaco activados con PHA, Con A y rIL-2. La K_D se encontró ser aproximadamente 0.47 nM y 0.83 nM para anticuerpo progenitor y desfucosilado, respectivamente.

Tabla 3 Análisis de Scatchard

Muestra		**L540**	**Humana**	**De Macaco**
CD30 Progenitor	**KD (nM prom)**	**1.37**	**1.08**	**0.47**
	Receptores Por Célula (prom)	**2496082**	**45654**	**72781**
CD30 Desfucosilado	**KD (nM prom)**	**1.93**	**2.66**	**0.83**
	Receptores Por Célula (prom)	**3024600**	**74258**	**108824**

Equivalentes

Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando nomás que la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas de la invención descritos en la presente. Tales equivalentes pretenden contemplarse por las siguientes reivindicaciones.

SUMARIO DE LISTA DE SECUENCIA

SEC. DE IDENT. NO:	SECUENCIA	SEC. DE IDENT. NO:	SECUENCIA
1	VH a.a. 5F11	19	VK CDR2 a.a. 5F11
2	VH a.a. 17G1	20	VK CDR2 a.a. 17G1
3	VH a.a. 2H9	21	VK CDR2 a.a. 2H9
4	VK a.a. 5F11	22	VK CDR3 a.a. 5F11
5	VK a.a. 17G1		VK CDR3 a.a. 17G1
6	VK a.a. 2H9	24	VK CDR3 a.a. 2H9
7	VH CDR1 a.a. 5F11		
8	VH CDR1 a.a. 17G1	25	VH 4-34 línea germinal a.a.
9	VH CDR1 a.a. 2H9	26	VH 3-07 línea germinal a.a.
10	VH CDR2 a.a. 5F11	27	VK L15 línea germinal a.a.
11	VH CDR2 a.a. 17G1	28	VK A27 línea germinal a.a.
12	VH CDR2 a.a. 2H9	29	VK L6 línea germinal a.a.
13	VH CDR3 a.a. 5F11	30	VH n.t. 5F11
14	VH CDR3 a.a. 17G1	31	VH n.t. 17G1
15	VH CDR3 a.a. 2H9	32	VH n.t. 2H9
16	VK CDR1 a.a. 5F11	33	VK n.t. 5F11
17	VK CDR1 a.a. 17G1	34	VK n.t. 17G1
18	VK CDR1 a.a. 2H9	35	VK n.t. 2H9

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD30 aislado, que carece de residuos de fucosa.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo intensifica la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células que expresan CD30 en superficie celular.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo, en forma fucosilada, no induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células L1236 (Depósito DSMZ No. Acc 530) en *vitro*, pero en forma desfucosilada induce ADCC de células L1236 en *vitro*, en donde la ADCC se valora por un ensayo de ADCC a una concentración de anticuerpo de 0.1 µg/ml y una proporción célula objetivo a célula efectora de 1:50.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que, en forma carente de fucosa, intensifica la ADCC de células L540 (Depósito DSMZ No. ACC 72), células L428 (Depósito DSMZ No. ACC 197) y células Karpas (Depósito DSMZ No. ACC 31) en *vitro* en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo, en donde la ADCC se valora por un ensayo de ADCC a una concentración de anticuerpo de 0.1 µg/ml y una proporción objetivo a efectora de 1:50.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, que es un anticuerpo humanizado o quimérico.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo humanizado o quimérico se prepara a partir de un anticuerpo anti-CD30 de ratón seleccionado del grupo que consiste de: AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 y Ber-H8.

8. El anticuerpo de la reivindicación 5, que es un anticuerpo humano.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo humano comprende una región variable de cadena pesada humana y una región variable de cadena ligera humana, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 1, 2 y 3; y

(b) la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 4, 5 y 6.

10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO.: 1 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO.: 4.

11. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO.: 2 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO.: 5.

12. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO.: 3 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO.: 6.

13. El anticuerpo de la reivindicación 5, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 7, 8, y 9;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 10, 11, y 12;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 13, 14, y 15;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 16, 17, y 18;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 19, 20, y 21; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS.: 22, 23, y 24.

14. El anticuerpo de la reivindicación 13, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:7;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:10;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:13;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:16;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:19; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:22.

15. El anticuerpo de la reivindicación 13, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:8;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:11;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:14;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:17;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:20; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:23.

16. El anticuerpo de la reivindicación 13, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:9;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:12;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:15;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:18;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:21; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO.:24.

17. El anticuerpo de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 4-34 o V_H 3-07

humano.

18. El anticuerpo de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L15, A27 o L6 humano.

19. El anticuerpo de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 4-34 o V_H 3-07 humano y una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L15, A27 o L6 humano.

20. Una célula huésped que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-CD30, en donde la célula huésped carece de una fucosiltransferasa de manera que el anticuerpo anti-CD30 expresado por la célula huésped carece de residuos de fucosa.

21. La célula huésped de la reivindicación 20, en donde los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana.

22. La célula huésped de la reivindicación 20, en donde la fucosiltransferasa es FUT8.

23. La célula huésped de la reivindicación 20, que es una célula CHO.

24. Un método para inhibir el crecimiento de

células $CD30^+$ que comprende contactar las células con un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células.

25. El método de la reivindicación 24, en donde las células son células tumorales.

26. El método de la reivindicación 24, en donde el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

27. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-CD30 desfucosilado en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan CD30 en el sujeto.

28. El método de la reivindicación 27, en donde el anticuerpo anti-CD30 es un anticuerpo humano.

29. El método de la reivindicación 27, en donde las células tumorales son células tumorales de Enfermedad de Hodgkin (HD).

30. El método de la reivindicación 27, en donde las células tumorales son células tumorales de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

31. El método de la reivindicación 27, en donde las células tumorales son de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de linfoma no de Hodgkin, linfoma de

Burkitt, linfomas cutáneos de células T, linfomas de célula hendida pequeña nodular, linfomas linfocíticos, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T del adulto (T-ALL), cánceres de linfomas foliculares entroblásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas de célula grande difusa de linaje B, linfoma de células T tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfoma de células T del adulto (ATL), linfomas basados en cavidad corporal asociados con HIV, Carcinomas Embrionarios, carcinomas desdiferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, Sarcoma de Kaposi, linfomas de células T CD30+ y linfomas de células B CD30+.

RESUMEN

La invención concierne a anticuerpos anti-CD30 que carecen de residuos fucosilo. Los anticuerpos de la invención exhiben actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, incluyendo la capacidad de lisar líneas celulares que expresan CD30 que no se lisan por la forma fucosilada de los anticuerpos. La invención también proporciona células huésped que expresan los anticuerpos anti-CD30 que carecen de residuos fucosilo, en donde las células huésped son deficientes para una fucosil transferasa. También se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos para inhibir el crecimiento de células CD30+, tales como células tumorales.

Anti-CD30 5F11 VH

Segmento V : Locus: 4-34

Segmento D : Locus - 7-27

segmento-J : JH4b

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

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

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

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


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

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

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

Fig. 1A

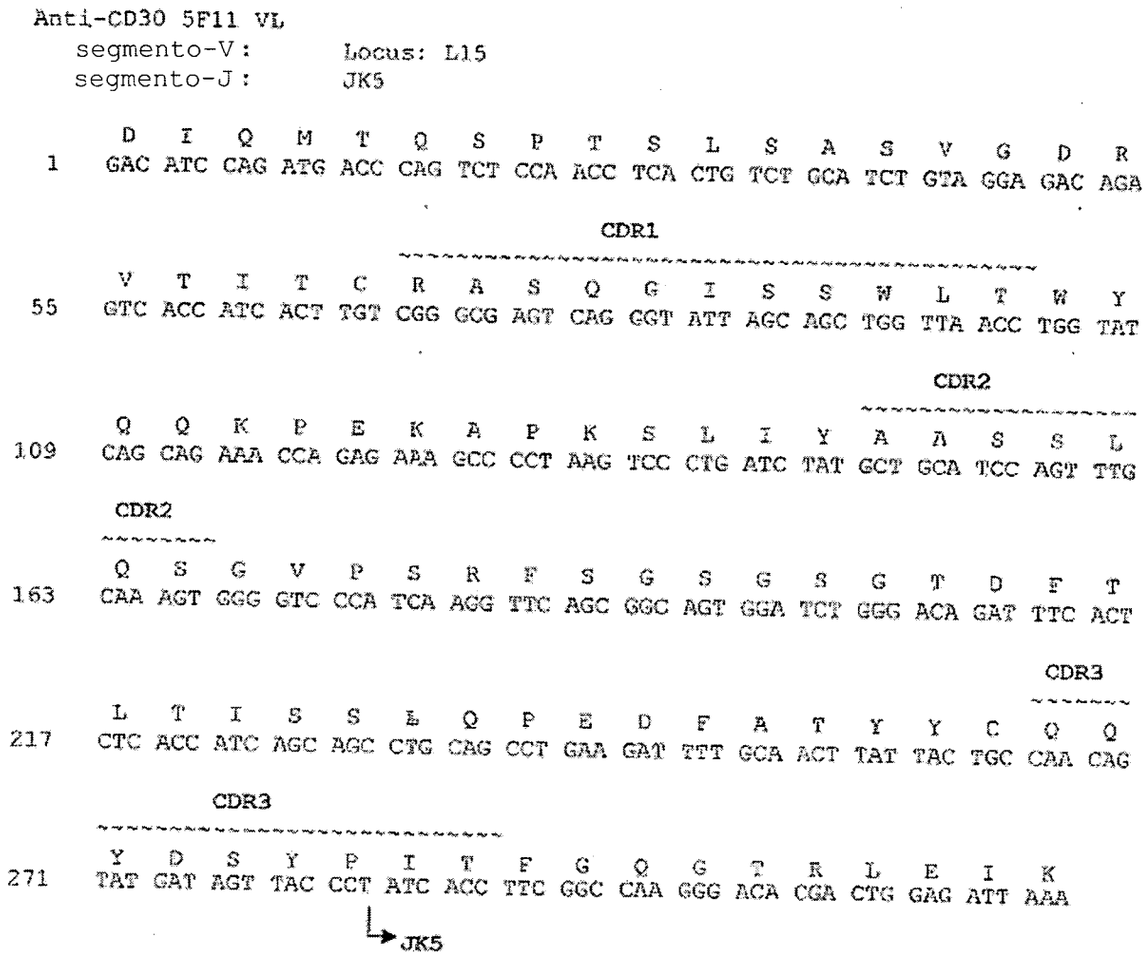

Anti-CD30 5F11 VL
segmento-V: Locus: L15
segmento-J: JK5
D I Q M T Q S P T S L S A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA ACC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
CDR1
V T I T C R A S Q G I S S W L T W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA ACC TGG TAT
CDR2
Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG
CDR2
Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR3
L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG
CDR3
Y D S Y P I T F G Q G T R L E I K
271 TAT GAT AGT TAC CCT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
JK5

Fig. 1B

Anti-CD30 17G1 VH

segmento-V : Locus: 3-07
segmento-D : No Encontrado
segmento-J : JH2

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

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

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

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

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

                                              CDR3
                                              ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   V   H   W   Y   F   H   L   W   G   R
271   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GTT CAT TGG TAC TTC CAT CTC TGG GGC CGT
                                              |
                                              ↳ JH2
      G   T   L   V   T   V   S   S
325   GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA
```

Fig. 2A

Anti-CD30 17G1 VL
segmento-V : Locus: A27
segmento-J : JK1

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

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

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

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

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

                CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q   Y   G   S   S   P   W   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                            ↳ JK1
```

Fig. 2B

Anti-2H9 CD30 VH
segmento-V : Locus: 4-34
segmento-D : Locus - 5-12
segmento-J : JH2

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 3A

Anti-2H9 CD30 VL
segmento-V: Locus: L6
segmento-J: JK1

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

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

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

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

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

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

Fig. 3B

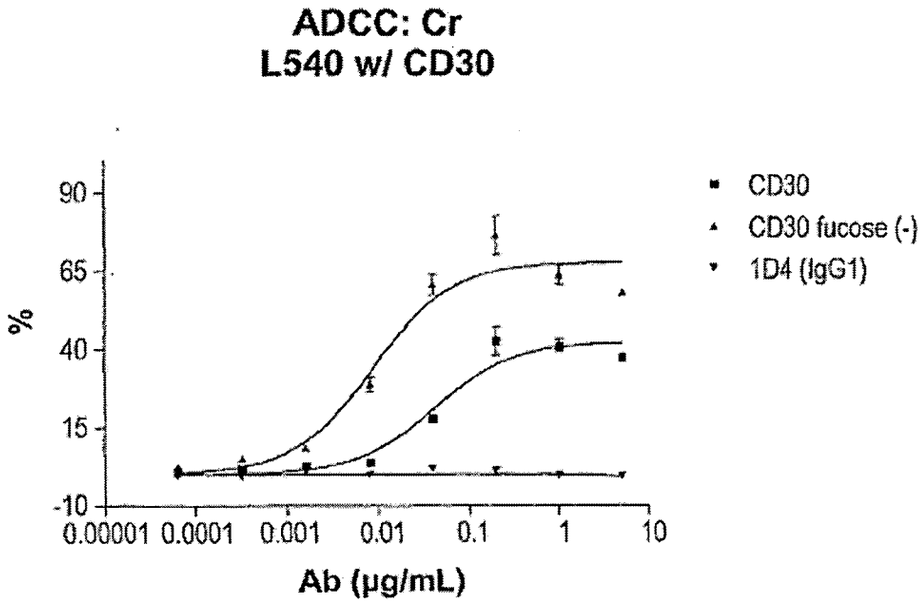

ADCC: Cr
L540 w/ CD30
90
65
40
15
-10
%
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 fucose (-)
1D4 (IgG1)

Fig. 4

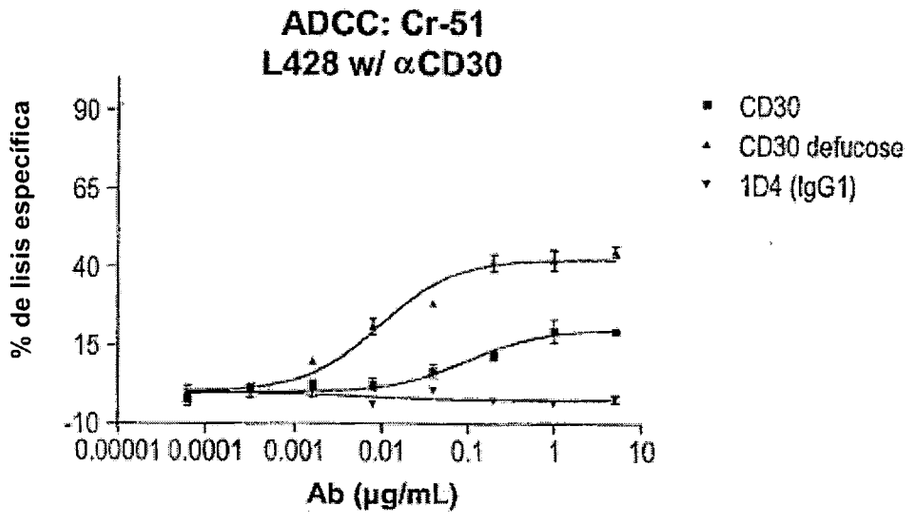

ADCC: Cr-51
L428 w/ αCD30
% de lisis específica
90
65
40
15
-10
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 defucose
1D4 (IgG1)

Fig. 5

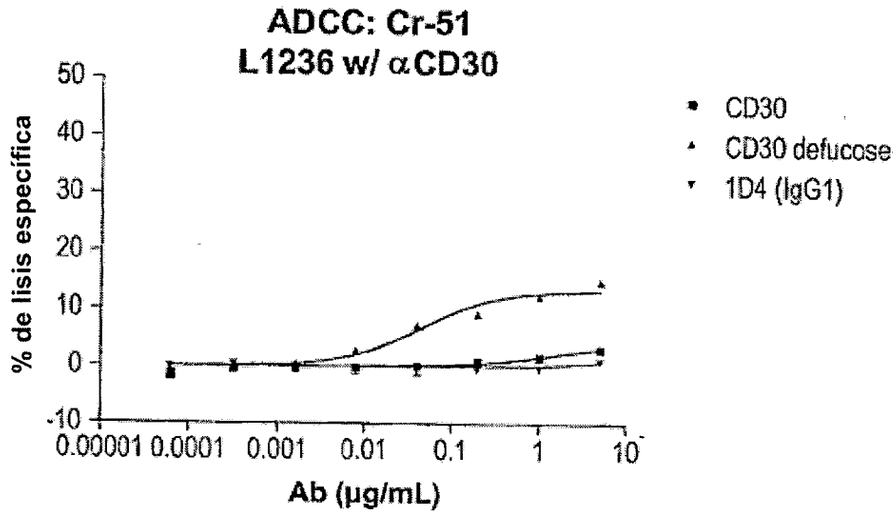

ADCC: Cr-51
L1236 w/ αCD30
% de lisis especifica
50
40
30
20
10
0
-10
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 defucose
1D4 (IgG1)

Fig. 6

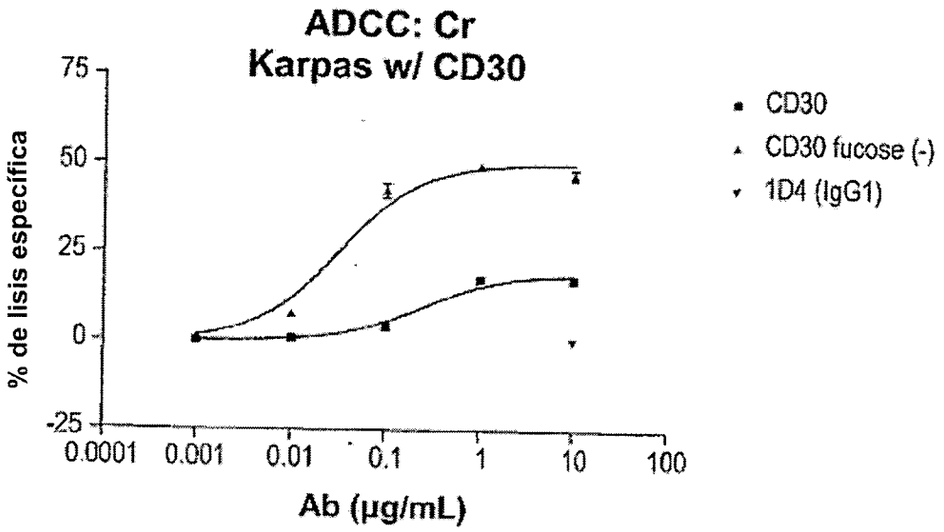

ADCC: Cr
Karpas w/ CD30
% de lisis especifica
75
50
25
0
-25
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (µg/mL)
CD30
CD30 fucose (-)
1D4 (IgG1)

Fig. 7

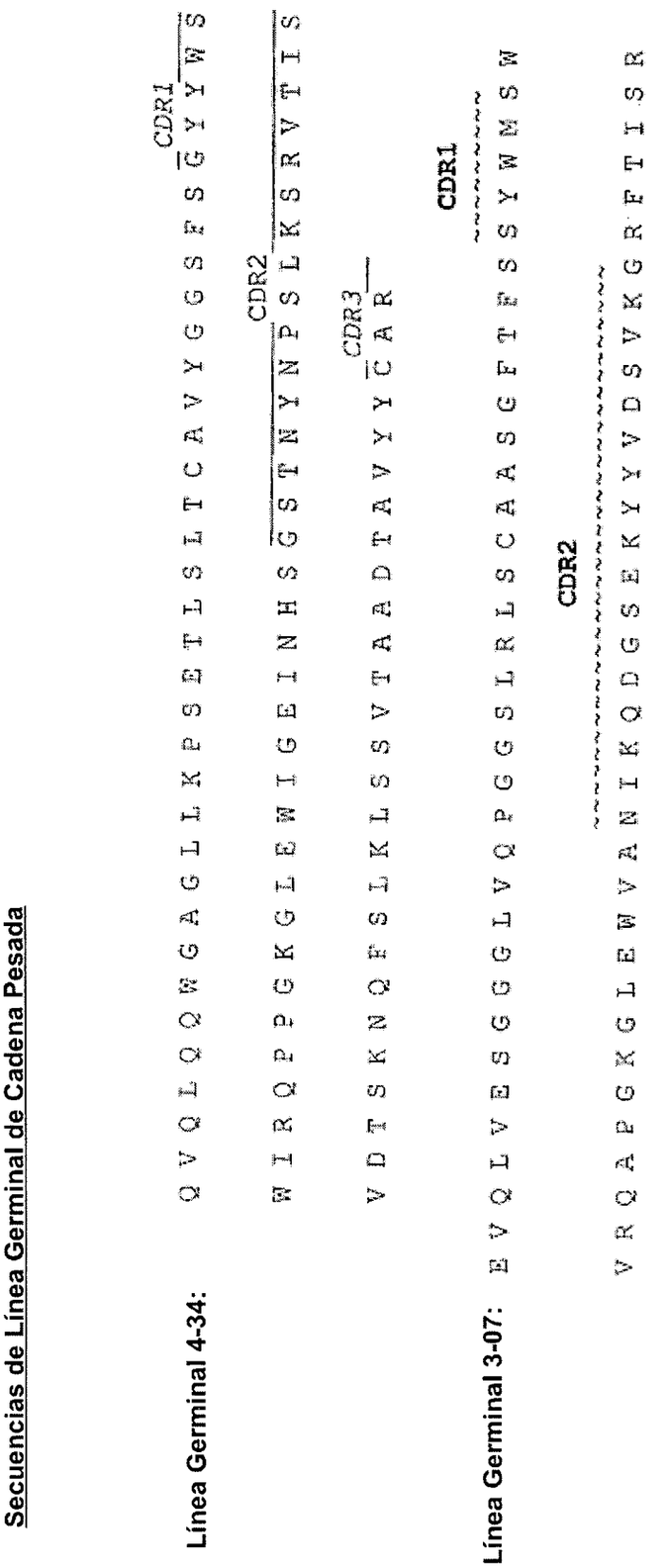

Secuencias de Línea Germinal de Cadena Pesada
Línea Germinal 4-34:
Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S
W I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S
V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
CDR1
CDR2
CDR3
Línea Germinal 3-07:
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M S W
V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R
D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
CDR1
CDR2

Fig. 8A

Secuencias de Línea Germinal de Cadena Liviana

Línea germinal L6:

CDR1
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
CDR2
W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
CDR3
T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W

Línea germinal A27:

CDR1
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2
GASSRAT
CDR3
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSS

Línea germinal L15:

CDR1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIY
CDR2
AASSLQS
CDR3
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSY

Fig. 8B

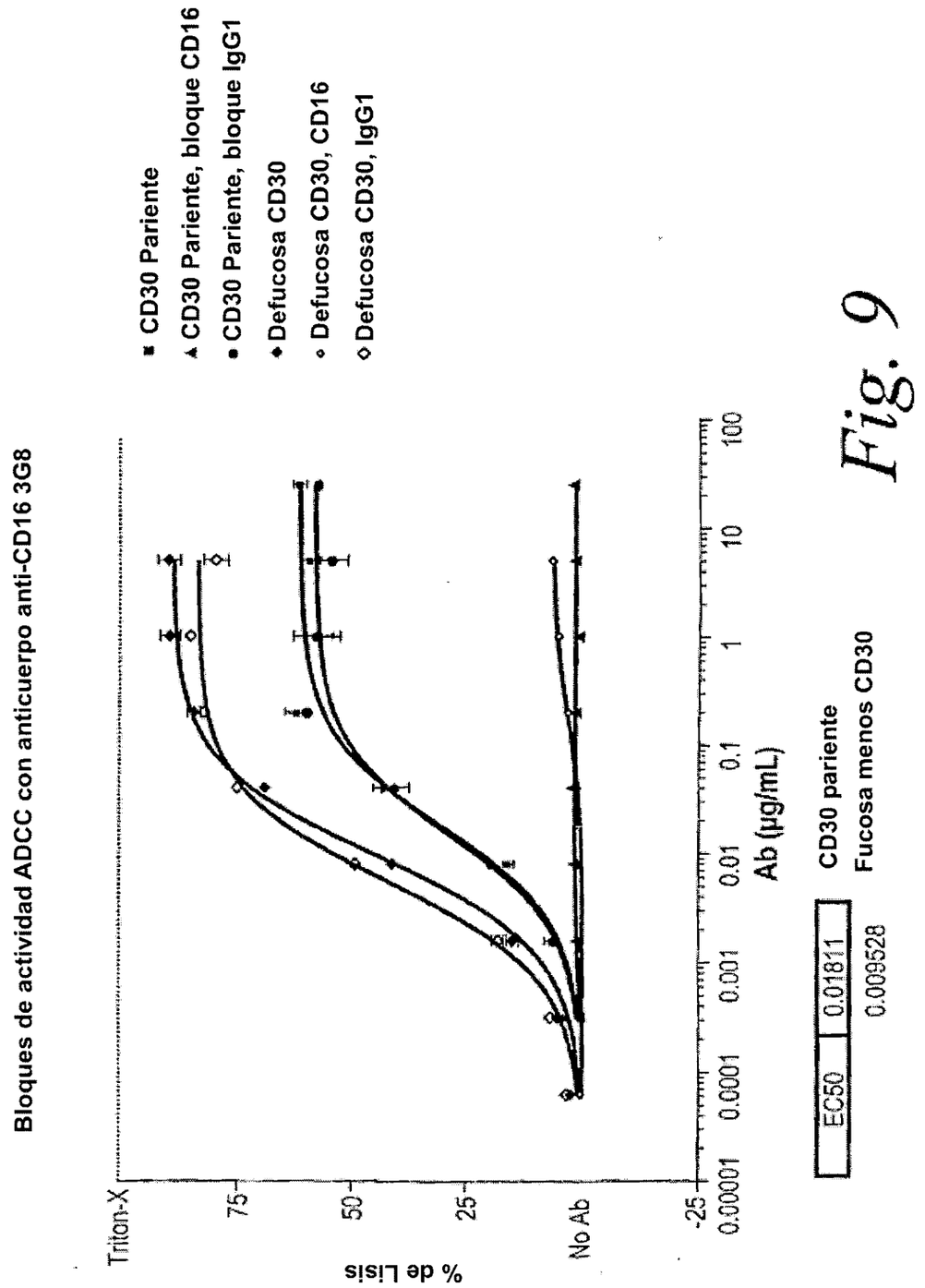

Bloques de actividad ADCC con anticuerpo anti-CD16 3G8
CD30 Pariente
CD30 Pariente, bloque CD16
CD30 Pariente, bloque IgG1
Defucosa CD30
Defucosa CD30, CD16
Defucosa CD30, IgG1
% de Lisis
Triton-X
No Ab
75
50
25
-25
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (µg/mL)
EC50
0.01811
0.009528
CD30 pariente
Fucosa menos CD30

Fig. 9

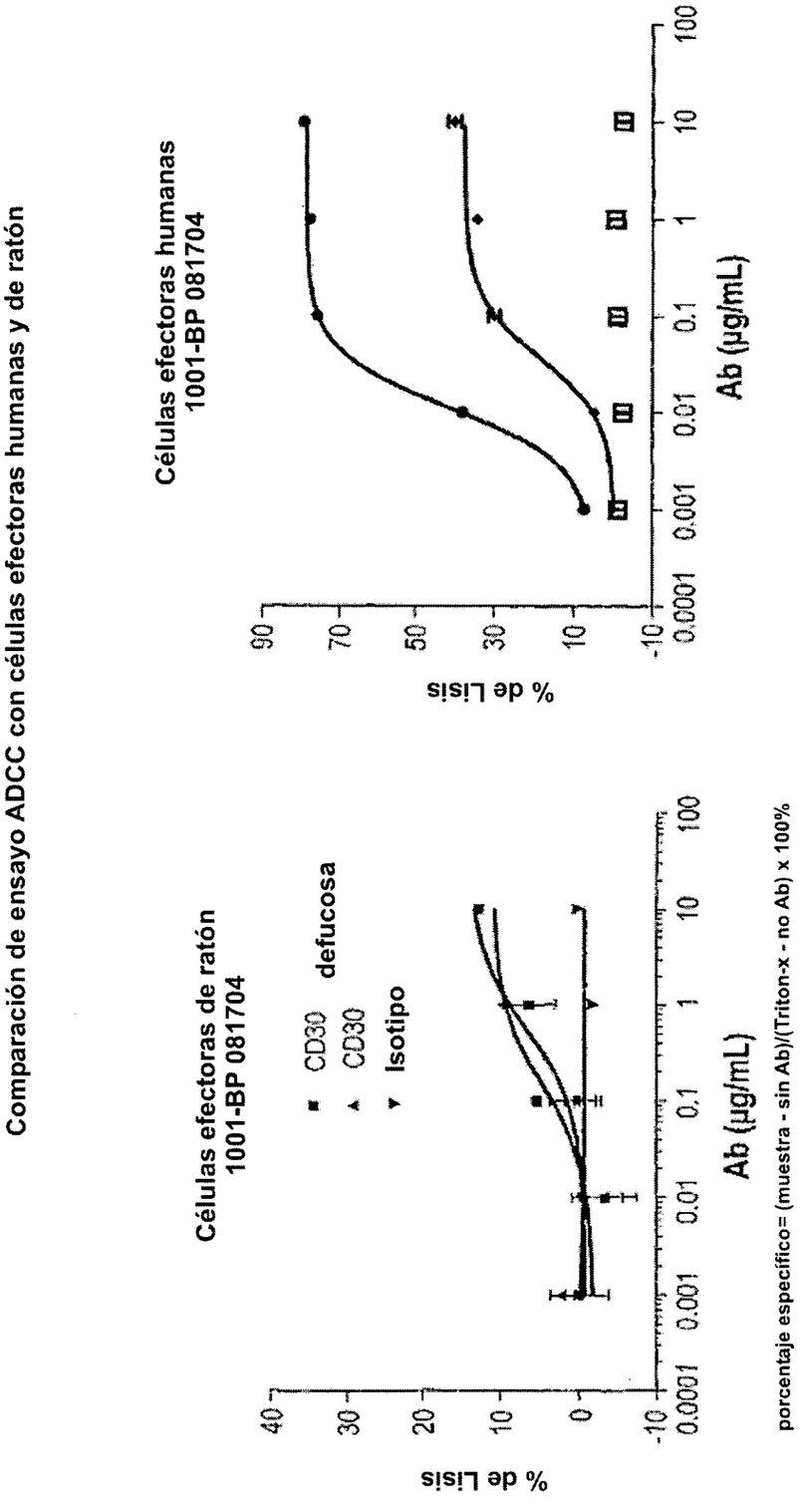

Comparación de ensayo ADCC con células efectoras humanas y de ratón
Células efectoras humanas
1001-BP 081704
% de Lisis
Ab (µg/mL)
Células efectoras de ratón
1001-BP 081704
CD30 defucosa
CD30
Isotipo
% de Lisis
Ab (µg/mL)
porcentaje específico= (muestra - sin Ab)/(Triton-x - no Ab) x 100%

Fig. 10

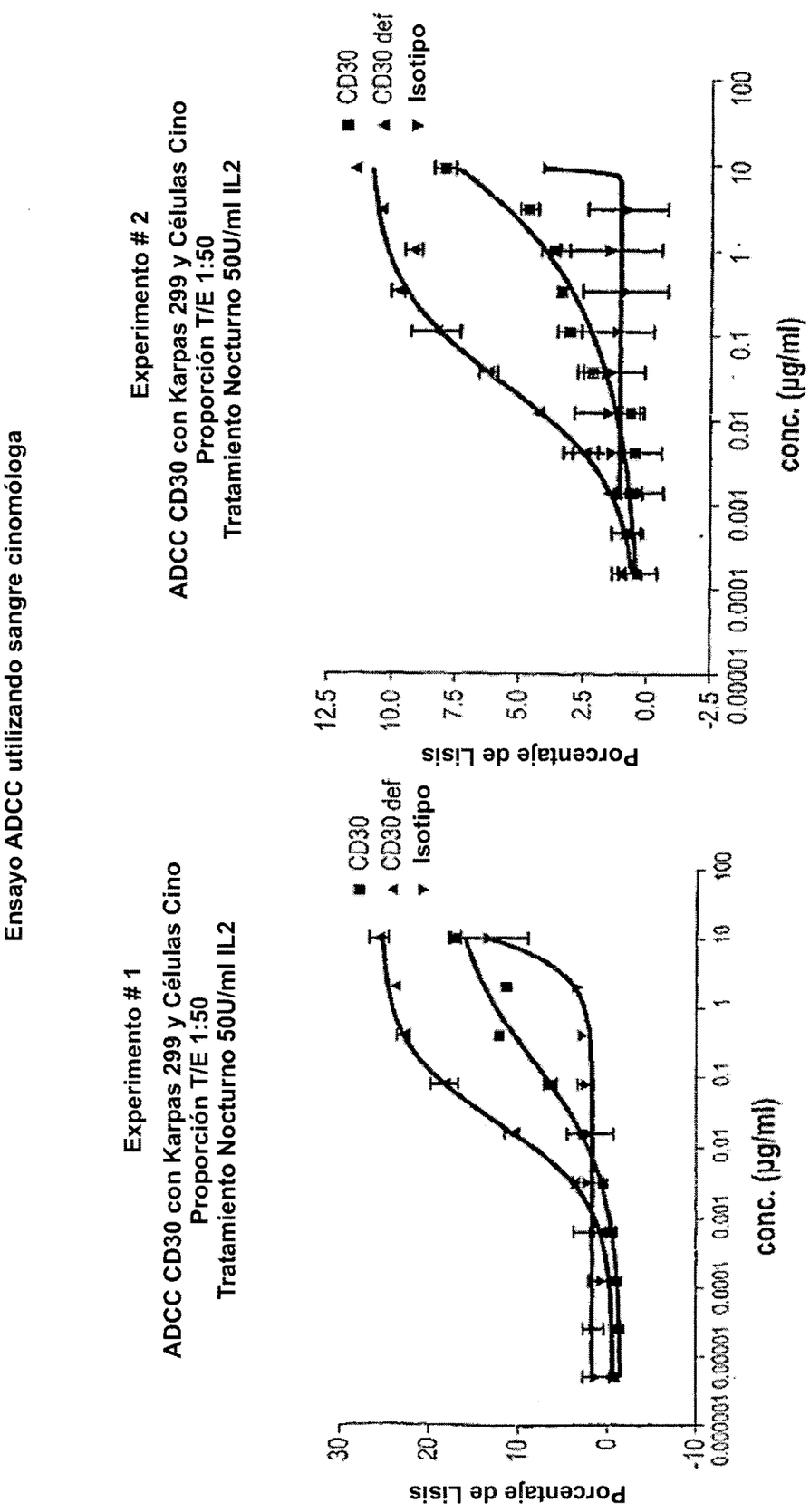

Ensayo ADCC utilizando sangre cinomóloga
Experimento # 1
ADCC CD30 con Karpas 299 y Células Cino
Proporción T/E 1:50
Tratamiento Nocturno 50U/ml IL2
Porcentaje de Lisis
conc. (µg/ml)
CD30
CD30 def
Isotipo
Experimento # 2
ADCC CD30 con Karpas 299 y Células Cino
Proporción T/E 1:50
Tratamiento Nocturno 50U/ml IL2
Porcentaje de Lisis
conc. (µg/ml)
CD30
CD30 def
Isotipo

Fig. 11

SEQUENCE LISTING

<110> MEDAREX, INC.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

<130> MXI-333PC

<140>
<141>

<150> 60/654,197
<151> 2005-02-18

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
            20                  25                  30

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

Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

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

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
  1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

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

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

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

<400> 5
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

<400> 6
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

<400> 7
Ala Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Asn Ser Trp Met Ser
1 5

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

<400> 9
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

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

<400> 12
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

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

<400> 13
Leu Thr Ala Tyr
1

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

<400> 14
Val His Trp Tyr Phe His Leu
1 5

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

<400> 15
Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5

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

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

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

<400> 18
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

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

<400> 19
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

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

<400> 20
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

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

<400> 21
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

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

<400> 22
Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5

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

<400> 23
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 26
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

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

<400> 27
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90

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

<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser
85 90 95

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

<400> 29
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
85 90

<210> 30
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 30
```
cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag   48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1               5                  10                  15

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

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

ggg gac atc aat cat ggt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag   192
Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg   240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

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

agc cta act gcc tac tgg ggc cag gga agc ctg gtc acc gtc tcc tca   336
Ser Leu Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 31
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 31
```
gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg   48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tct   96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
            20                  25                  30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg   144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

```
gcc aac ata aac gaa gat gga agt gag aaa ttc tat gtg gac tct gtg   192
Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc ttc tcc aga gac aac gcc gag aac tca ctg tat   240
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
 65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg agg gtt cat tgg tac ttc cat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc   336
Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

act gtc tcc tca                                                   348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 32
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

act gtc tcc tca                                                   348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 33
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 34
```
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg   48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 35
```
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg   48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1               5                  10                  15

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

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

```
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ctc agt ggc   192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Leu Ser Gly
     50                  55                  60

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

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt caa cag cgt agc aac tgg ccg tgg   288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
                 85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
MXI-333PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2006/005854	17/02/2006	18/02/2005
Applicant		
MEDAREX, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [X] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant
   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING FUCOSYL RESIDUES

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/005854

314

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/029092 A (LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES; DE ROME) 8 April 2004 (2004-04-08) abstract page 2, last paragraph page 6, last paragraph --- -/--	1-31

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 September 2006	02/11/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Dumont, Elisabeth

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

36

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMANE-OHNUKI N ET AL: "Establishment of FUT8 knockout chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, INTERSCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 87, no. 5, 5 September 2004 (2004-09-05), pages 614-622, XP002983153 ISSN: 0006-3592 cited in the application the whole document	1-31
Y	SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 278, no. 5, 31 January 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002355427 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-31
Y	WO 03/059282 A (MEDAREX, INC; KELER, TIBOR; GRAZIANO, ROBERT; TREML, JOHN; DEO, YASHWA) 24 July 2003 (2003-07-24) the whole document, especially page 1 - page 9; figures 7-13; examples 1-8	1-31
Y	US 2004/006215 A1 (KELER TIBOR [US] ET AL) 8 January 2004 (2004-01-08) the whole document	1-31
Y	KOON HENRY B ET AL: "Anti-CD30 antibody-based therapy" CURRENT OPINION IN ONCOLOGY, vol. 12, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 588-593, XP009069280 ISSN: 1040-8746 abstract page 588, paragraph 1 - page 589, column 1, paragraph 2 page 590; table 1	1-31

-/--

2

317

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2006/039644 A (MEDAREX, INC; KELER, TIBOR; STRANDMANN, ELKE, POGGE, VON; ENGERT, ANDR) 13 April 2006 (2006-04-13) the whole document, especially page 1 - page 3 page 25, last paragraph - page 26, paragraph 1	1-31
A	CLYNES RAPHAEL A ET AL: "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 443-446, XP002291039 ISSN: 1078-8956 the whole document	1-31

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/005854 318

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 24-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [X] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-31 (all partially)

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /005854

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody AC10

   ---

2. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody HeFi-1

   ---

3. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody Ber-H2

   ---

4. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody Ki-1

   ---

5. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody Ki-4

   ---

6. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody HRS-3

   ---

7. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody Irac

   ---

8. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody HRS-4

   ---

9. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

   subject-matter relating to anti-CD30 antibody M44

   ---

10. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

    subject-matter relating to anti-CD30 antibody M67

    ---

11. claims: claims 1-8, 20-31, all partially

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

subject-matter relating to anti-CD30 antibody Ber-H8

---

12. claims: claims 1-6, 8-31, all partially

subject-matter relating to anti-CD30 antibody 5F11

---

13. claims: claims 1-6, 8-31, all partially

subject-matter relating to anti-CD30 antibody 17G1

---

14. claims: claims 1-6, 8-31, all partially

subject-matter relating to anti-CD30 antibody 2H9

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004029092 A	08-04-2004	AU 2003282160 A1	19-04-2004
		CA 2498787 A1	08-04-2004
		EP 1537147 A2	08-06-2005
		FR 2844513 A1	19-03-2004
		JP 2006516951 T	13-07-2006
		US 2006127392 A1	15-06-2006
WO 03059282 A	24-07-2003	AU 2003205055 A1	30-07-2003
		BR 0306808 A	30-08-2005
		CA 2471702 A1	24-07-2003
		CN 1638800 A	13-07-2005
		EP 1471938 A2	03-11-2004
		JP 2005534281 T	17-11-2005
		MX PA04006490 A	08-06-2005
US 2004006215 A1	08-01-2004	NONE	
WO 2006039644 A	13-04-2006	NONE	

323

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-^

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 72,886
^A : SEPTIEMBRE 10 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-096516- -00000-0000
Fecha: 2007-09-18 16:51:31 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 323

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769921	10/09/2007	51,530,000.00

***** C O N C E P T O *****

IT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL : $	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Colo 16033-841-003-8

324

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-096516- -00000-0000

Fecha: 2007-09-18 16:51:31 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 323

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]
- Descripción de la invención [x]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia M Nova S
Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia