

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 737**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04750579 .7**  
96 Fecha de presentación: **23.04.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1631590**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **ANTICUERPOS HUMANIZADOS CONTRA EL RECEPTOR DE INTERFERON ALFA 1 (IFNAR-1).**

30 Prioridad:  
**23.04.2003 US 465058 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2011**

73 Titular/es:  
**Medarex, Inc.**  
**707 State Road**  
**Princeton, NJ 08540-1437, US**

72 Inventor/es:  
**CARDARELLI, Josephine, M.;**  
**CHEN, Tseng-hui, Timothy;**  
**KING, David;**  
**BEBBINGTON, Christopher, R.;**  
**POGUE, Sarah, Lee;**  
**CARR, Francis J. y**  
**WILLIAMS, Stephen**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

ES 2 368 737 T3

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados contra el receptor de interferón alfa 1 (IFNAR-1)

**Antecedentes de la invención**

5 Los interferones de tipo I (IFN) (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ ) son una familia de citocinas estructuralmente relacionadas que tienen efectos antivirales, antitumorales e inmunomoduladores (Hardy y col, Blood. 97: 473, 2001; Cutrone y Langer, J. Biol. Chem. 276: 17140, 2001). El locus de IFN $\alpha$  humano incluye dos subfamilias. La primera subfamilia consiste en 14 genes no alélicos y 4 pseudogenes que tienen una homología de al menos el 80 %. La segunda subfamilia,  $\alpha$ II u omega ( $\omega$ ), contiene 5 pseudogenes y 1 gen funcional que presenta una homología del 70 % con los genes de IFN $\alpha$  (Weissmann y Weber, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 33: 251-300, 1986). Los subtipos de IFN $\alpha$  tienen actividades específicas diferentes pero poseen el mismo espectro biológico (Streuli y col. PNAS-USA 78: 2848, 1981) y tienen el mismo receptor celular (Agnat M. y col. en "Interferon 5ª Ed. 1. Gresser págs. 1-22, Academic Press, Londres 1983).

El interferón  $\beta$  (IFN  $\beta$ ) está codificado por un solo gen que tiene una homología de aproximadamente el 50 % con los genes de IFN $\alpha$ .

15 El interferón gamma, que lo producen linfocitos activados, no posee ninguna homología con los interferones alfa/beta y no reacciona con su receptor.

20 Todos los interferones de tipo I humanos se unen a un receptor de superficie celular (receptor de IFN alfa, IFNAR), que consiste en dos proteínas transmembrana, IFNAR-1 e IFNAR-2. El IFNAR-1 es esencial para la unión de alta afinidad y la especificidad diferencial del complejo de IFNAR (Cutrone, 2001, anteriormente). Aunque no se han identificado diferencias funcionales para cada uno de los subtipos de IFN de tipo I, se cree que cada uno puede presentar diferentes interacciones con los componentes del receptor IFNAR, conduciendo a resultados de señalización potencialmente diversos (Cook y col. (1996) J. Biol. Chem., 271: 13448). En particular, los estudios que usaron formas mutantes de IFNAR-1 e IFNAR-2 sugirieron que los interferones alfa y beta señalizan de forma diferente a través del receptor interaccionando de forma diferencial con las cadenas respectivas (Lewerenz y col. (1998) J. Mol. Biol. 282: 585).

25 Estudios funcionales anteriores de IFN de tipo I se centraron en la defensa innata contra infecciones víricas (Haller y col. (1981) J. Exp. Med. 154: 199; Lindenmann y col. (1981) Methods Enzymol. 78: 181). Estudios más recientes, sin embargo, implican a IFN de tipo I como citocinas inmunorreguladoras potentes en la respuesta inmune adaptativa. En concreto, se ha demostrado que los IFN de tipo I facilitan la diferenciación de células T sin estimulación previa a lo largo de la ruta Th1 (Brinkmann y col. (1993) J. Exp. Med. 178: 1655), aumentan la producción de anticuerpos (Finkelman y col. (1991) J. Exp. Med. 174: 1179) y apoyan la actividad funcional y la supervivencia de células T de memoria. (Santini, y col. (2000) J. Exp. Med. 191: 1777; Tough y col. (1996) Science 272:1947).

30 Un trabajo reciente realizado por varios grupos sugiere que IFN- $\alpha$  puede aumentar la maduración o activación de células dendríticas (DC) (Santini, y col. (2000) J. Exp. Med., 191: 1777; Luft y col. (1998) J. Immunol., 161: 1947; Luft y col. (2002) Int. Immunol. 14: 367; Radvanyi y col. (1999) Scand. J. Immunol. 50: 499). Además, la expresión aumentada de interferones de tipo I se ha descrito en numerosas enfermedades autoinmunes (Foulis y col. (1987) Lancet, 2: 1423; Hooks y col. (1982) Arthritis Rheum 25: 396; Hertzog y col. (1988) Clin. Immunol. Immunopathol. 48: 192; Hopkins y Meager (1988) Clin. Exp. Immunol. 73: 88; Arvin y Miller (1984) Arthritis Rheum. 27: 582). Los ejemplos más estudiados de éstas son la diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) (Foulis (1987) anteriormente) y el lupus eritematoso sistémico (LES) (Hooks (1982) anteriormente), que están asociadas con niveles elevados de IFN- $\alpha$ , y la artritis reumatoide (AR) (Hertzog (1988), Hopkins y Meager (1988), Arvin y Miller (1984), anteriormente) en la que el IFN- $\beta$  puede desempeñar un papel más significativo.

35 Además, se ha descrito que la administración de interferón alfa empeora la enfermedad subyacente en pacientes con psoriasis y esclerosis múltiple e induce un síndrome de tipo LES en pacientes sin un historial previo de enfermedad autoinmune. También se ha demostrado que el interferón  $\alpha$  induce glomerulonefritis en ratones normales y acelera la aparición de la enfermedad autoinmune espontánea de ratones NZB/W. Además, se ha demostrado que la terapia con IFN- $\alpha$  conduce en algunos casos a efectos secundarios no deseados, incluyendo fiebre y trastornos neurológicos. Por lo tanto, existen situaciones patológicas en las que la inhibición de la actividad de IFN de tipo I puede ser beneficiosa para el paciente y existe la necesidad de agentes eficaces para inhibir la actividad de IFN de tipo I.

**Sumario de la invención**

40 La presente invención proporciona antagonistas de las actividades biológicas del IFN de tipo I humano. Estos antagonistas pueden usarse con fines terapéuticos (incluyendo la profilaxis), por ejemplo en situaciones en las que la producción o expresión de IFN de tipo I (IFN $\alpha$ / $\omega$ / $\tau$ ) está asociada con síntomas patológicos. Dichos antagonistas también pueden usarse para el diagnóstico de diversas enfermedades o para el estudio de la evolución de dichas enfermedades. La invención proporciona anticuerpos humanizados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que se han injertado secuencias de CDR murinas directamente en secuencias flanqueantes humanas no modificadas, dando

como resultado anticuerpos funcionales de alta afinidad. Además, la invención proporciona anticuerpos humanizados que comprenden modificaciones de anticuerpos adicionales para disminuir la antigenicidad del propio anticuerpo.

5 Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de IFN alfa 1 puede comprender

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de región determinante de complementariedad de la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3; y

10 una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de región determinante de complementariedad de la SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6; y  
regiones flanqueantes de dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano o región flanqueante de consenso de anticuerpo humano, en el que las regiones flanqueantes de dominio variable están inalteradas respecto al anticuerpo humano o región flanqueante de consenso de anticuerpo humano.

Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de IFN alfa 1 puede tener una región variable de cadena pesada que comprende:

15 la secuencia de aminoácidos de la CDR1 (SEC ID N°: 1), CDR2 (SEC ID N°: 2) y CDR3 (SEC ID N°: 3) del anticuerpo murino 64G12, en la que se ha realizado al menos una sustitución de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la CDR3 (SEC ID N°: 3), y  
regiones flanqueantes de dominio variable derivadas de un anticuerpo humano o una región flanqueante de consenso de anticuerpo humano.

20 Preferentemente, el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado conserva al menos el 50 % de la afinidad de unión al receptor de IFN alfa 1 del anticuerpo murino 64G12. En la presente realización, las regiones flanqueantes de dominio variable pueden estar inalteradas respecto al anticuerpo humano o a la región flanqueante de consenso de anticuerpo humano, o pueden contener sustituciones específicas dentro de los restos de región  
25 flanqueante. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de aminoácido en la posición 4 de la CDR3. Preferentemente, esta sustitución es una sustitución de prolina en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, E, V, C y R. En otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de aminoácido en la posición 11 de la CDR3. Preferentemente, esta sustitución es una sustitución de tirosina. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende además una región  
30 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 (SEC ID N°: 4), CDR2 (SEC ID N°: 5) y CDR3 (SEC ID N°: 6) del anticuerpo murino 64G12.

Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de IFN alfa 1 puede comprender

35 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 (SEC ID N°: 1), CDR2 (SEC ID N°: 2) y CDR3 (SEC ID N°: 3) del anticuerpo murino 64G12; y  
una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 (SEC ID N°: 4), CDR2 (SEC ID N°: 5) y CDR3 (SEC ID N°: 6) del anticuerpo murino 64G12; y  
en el que el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: 24H, 29H, 37H, 40H, 71H, 78H, 19L, 37L, 46L, 58L, 70L y 83L.

40 en el que la posición de aminoácido de cada miembro del grupo está indicada usando el sistema de numeración expuesto en Kabat.

La sustitución de aminoácidos es una sustitución de alanina en lugar de fenilalanina en el resto 24H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de metionina en lugar de leucina en el resto 29H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de alanina en lugar de leucina en el resto 29H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de isoleucina en lugar de valina en el resto 37H y una  
45 sustitución de treonina en lugar de alanina en el resto 40H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de prolina en lugar de alanina en el resto 40H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de lisina en lugar de arginina en el resto 71H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de leucina en lugar de valina en el resto 78H, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una  
50 sustitución de alanina en lugar de valina en el resto 19L, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de leucina en lugar de glutamina en el resto 37L, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de alanina en lugar de leucina en el resto 46L, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de isoleucina en lugar de valina en el resto 58L, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, una sustitución de ácido aspártico en lugar de serina en el resto 70L, usando el sistema de numeración expuesto en Kabat, o una sustitución de treonina en lugar de fenilalanina en el resto 83L, usando el sistema de numeración  
55 expuesto en Kabat.

Los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo humanizados preferidos de la invención son los que comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que

consiste en la SEC ID N°: 15 de la Figura 1I (M3-B), la SEC ID N°: 17 de la Figura 1K (DI M3) y la SEC ID N°: 18 de la Figura 1L (DI M3-B); y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 21 de la Figura 2C (K1). Los emparejamientos preferidos de regiones variables de cadena pesada y ligera incluyen: una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 17 de la Figura 1K (DI M3), y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos como expone en la SEC ID N°: 21 de la Figura 2C (K1), una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos como expone en la SEC ID N°: 15 de la Figura 1I (M3-B), y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos como expone en la SEC ID N°: 21 de la Figura 2C (K1) o una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 18 de la Figura 1L (DI M3-B), y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos como expone en la SEC ID N°: 21 de la Figura 2C (K1).

En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden además dominios constantes pesados y ligeros humanos. En una realización preferida, la región constante pesada humana se selecciona del grupo que consiste en gamma 1, gamma 2, gamma 3 y gamma 4 humanas. Más preferentemente, la región constante pesada humana es gamma 1. En otras realizaciones más, los anticuerpos humanizados de la invención tienen una afinidad de unión a receptor de IFN alfa 1 con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, más preferentemente una afinidad de unión con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos. Por "una afinidad de unión con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos" se entiende una afinidad de unión de  $1 \times 10^{-7}$  M o una afinidad de unión global superior. En otras realizaciones, la afinidad de unión está dentro de un intervalo de  $1 \times 10^{-7}$  a  $5 \times 10^{-10}$  M, o dentro de un intervalo de  $1 \times 10^{-8}$  a  $5 \times 10^{-10}$  M, o dentro de un intervalo de  $1 \times 10^{-9}$  a  $5 \times 10^{-10}$  M. En otras realizaciones más, los anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados, o fragmentos de anticuerpo, de la invención son biológicamente activos *in vitro* e *in vivo* e inhiben respuestas biológicas inducidas por múltiples interferones de tipo I.

Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para inhibir la unión de interferón de tipo I al receptor de IFN alfa 1 en una célula que exprese receptor de IFN alfa 1. El procedimiento comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado de la invención de modo que se inhiba la unión del interferón de tipo I al receptor de IFN alfa 1. En otro aspecto más, la invención se refiere a procedimientos para la inhibición de una respuesta inmune en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado de la invención de modo que se inhiba una respuesta inmune. La respuesta inmune que se inhibirá puede ser una en la que, por ejemplo, la expresión de MHC clase I o MHC clase II en células esté modulada, o en la que se induzca el desarrollo de células dendríticas o que esté caracterizada por una reacción de linfocitos mixta. La inhibición de la respuesta inmune puede incluir la inhibición de células aloestimuladoras tales como células dendríticas inducidas por GM-CSF/IFN.

La invención proporciona además procedimientos para tratar trastornos autoinmunes, rechazo de trasplantes o enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en un sujeto. Los procedimientos comprenden administrar al sujeto un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo de la invención de modo que el sujeto se trate para trastorno autoinmune, rechazo de trasplante o EICH. En una realización, el trastorno autoinmune es enfermedad inflamatoria del intestino (EII). En otra realización, el trastorno autoinmune es lupus eritematoso sistémico (LES). En otra realización más, el trastorno autoinmune es diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID). En otra realización más, el trastorno autoinmune es artritis reumatoide (AR).

La invención proporciona además procedimientos para modificar los niveles de proteína C reactiva (CRP) en suero en un sujeto, procedimientos para modificar los niveles de neopterin en suero en un sujeto y procedimientos para modificar la proliferación de células B en un sujeto, comprendiendo dichos procedimientos administrar un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo de la invención al sujeto.

Los anticuerpos anti-IFNAR-1 quiméricos o fragmentos de anticuerpo, pueden comprender un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-IFNAR-1 murino 64G12 (SEC ID N°: 7 de la Figura 1A y SEC ID N°: 19 de la Figura 2A, respectivamente), unidos operativamente a regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas. Las regiones constantes de cadena pesada humanas preferidas incluyen gamma 1 humana, gamma 2 humana, gamma 3 humana y gamma 4 humana, más preferentemente gamma 1 humana.

### **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-1L son esquemas que muestran las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada murina y de las regiones variables de cadena pesada de anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas. Las sustituciones realizadas en restos de CDR o regiones flanqueantes están en cursiva.

La Figura 1A es la región variable de cadena pesada del 64G12 murino original. Se clonó por amplificación a partir de una genoteca de ADNc sintetizada a partir de ARNm extraído del hibridoma 64G12 combinando un cebador 5' (atgggcagacttacattcattctctg) (SEC ID N°: 43), y un cebador 3' (cagtgtagacagatggggg) (SEC ID N°: 44) que es complementario al dominio CH1 de IgG1 murina. Las secuencias de CDR de la cadena pesada de 64G12 están subrayadas.

La Figura 1B es una región variable de cadena pesada diseñada por combinación de las CDR y otros aminoácidos

de la secuencia murina con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-28.

La Figura 1C es una región variable de cadena pesada diseñada por combinación de la CDR-3 de la secuencia murina con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-28.

5 La Figura 1D es una región variable de cadena pesada diseñada por combinación de las CDR y otros aminoácidos de la secuencia murina con una secuencia flanqueante de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

La Figura 1E es una región variable de cadena pesada diseñada por combinación de las CDR y otros aminoácidos de la secuencia murina con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-47.

10 La Figura 1F es la cadena pesada M3 con el aminoácido X sustituido con L, N, E, V, A, C, G, S, R, D, M, H, T, W, K o I.

La Figura 1G es la cadena pesada M3 con el aminoácido X sustituido con L, E, Q, R, V, A, F, G, C, T, W, H, K, D, S o I.

15 La Figura 1H es la cadena pesada M3 con un epítipo de células T eliminado por sustitución de un aminoácido en la región CDR-1 (en cursiva).

La Figura 1I es la cadena pesada M3 con un epítipo de células T eliminado por sustitución de un aminoácido en la región CDR-2 (en cursiva).

La Figura 1J es la cadena pesada M3 con dos epítopos de células T eliminados por sustitución de aminoácidos en las regiones CDR-1 y 2 (en cursiva).

20 La Figura 1K es la cadena pesada M3 con todos sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

La Figura 1L es la cadena pesada M3 con todos sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante y en la región CDR-2.

25 Las Figuras 2A-2S son esquemas que muestran las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera murina y de las regiones variables de cadena ligera de anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas. Las sustituciones realizadas en restos de CDR o regiones flanqueantes están en cursiva.

30 La Figura 2A es la región variable de cadena ligera del 64G12 murino original. Se clonó por amplificación de una genoteca de ADNc sintetizada a partir de ARNm extraído del hibridoma 64G12 combinando un cebador 5' (ctcaccagctctccaaccaccatggctgcatc) (SEC ID N°: 46) que está basado en la secuencia peptídica N-terminal del anticuerpo, y un cebador 3' (actggatggtgggaagatgg) (SEC ID N°: 45), que es complementario al dominio constante kappa murino. Las secuencias de CDR de la cadena ligera del 64G12 están subrayadas.

35 La Figura 2B es una región variable de cadena ligera diseñada por combinación de las CDR y otros aminoácidos de la secuencia murina con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena ligera de inmunoglobulina humana DPK-26.

La Figura 2C es una región variable de cadena ligera diseñada por combinación de las CDR y otros aminoácidos de la secuencia murina con una secuencia flanqueante de cadena kappa de inmunoglobulina humana.

La Figura 2D es la cadena ligera K1 con uno de sus epítopos de células T potenciales eliminado por cambio del aminoácido en cursiva en la CDR-1.

40 La Figura 2E es la cadena ligera K1 con uno de sus epítopos de células T potenciales eliminado por cambio del aminoácido en cursiva en la CDR-1.

La Figura 2F es la cadena ligera K1 con uno de sus epítopos de células T potenciales eliminado por cambio del aminoácido en cursiva en la CDR-3.

45 La Figura 2G es la cadena ligera K1 con dos de sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la CDR-1.

La Figura 2H es la cadena ligera K1 con dos de sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en las CDR-1 y 3.

La Figura 2I es la cadena ligera K1 con dos de sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en las CDR-1 y 3.

50 La Figura 2J es la cadena ligera K1 con tres de sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en las CDR-1 y 3.

La Figura 2K es la cadena ligera K1 con todos sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

55 La Figura 2L es la cadena ligera K1 con todos sus epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante y en la CDR-1.

La Figura 2M es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

60 La Figura 2N es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante y en la CDR-1.

La Figura 2O es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

La Figura 2P es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

65 La Figura 2Q es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

La Figura 2R es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por

cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

La Figura 2S es la cadena ligera K1 con cinco de los seis epítopos de células T potenciales eliminados por cambio de los aminoácidos en cursiva en la región flanqueante.

5 Las Figuras 3A-3D muestran las secuencias de ácidos nucleicos de las regiones variables de cadena pesada M3 (FIG. 3A) y DI M3-B (FIG. 3C), y las regiones variables de cadena ligera K1 (FIG. 3B) y K1-C (FIG. 3D).

Las Figuras 4A-4B son gráficas que muestran la inhibición de la actividad de IFN- $\alpha$  (FIG. 4A) e IFN- $\beta$  (FIG. 4B) por anticuerpos humanizados anti-IFNAR-1, según se midió en un ensayo de gen indicador sensible a interferón.

10 La Figura 5 es una gráfica de barras que muestra la reversión de la actividad biológica de múltiples subtipos de IFN alfa mediante un anti-IFNAR-1 humanizado.

### **Descripción detallada de la invención**

15 La presente invención proporciona nuevos anticuerpos humanizados dirigidos contra el receptor de interferón alfa 1 (IFNAR-1) de acuerdo con la reivindicación 1. En un aspecto, los anticuerpos humanizados de la presente invención contienen regiones flanqueantes (FR) que están inalteradas respecto a secuencias de línea germinal humanas. En otros aspectos, los anticuerpos humanizados contienen mutaciones dentro de regiones CDR, en comparación con el anticuerpo murino donador, preferentemente en la CDR3, por ejemplo para mejorar la unión del anticuerpo. En otros aspectos más, los anticuerpos humanizados contienen mutaciones dentro de las regiones flanqueantes, en comparación con las secuencias de línea germinal humanas, por ejemplo, para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos (por ejemplo, para eliminar epítopos de células T). Los anticuerpos de la invención pueden usarse con fines terapéuticos, por ejemplo, en casos en los que la producción o expresión de interferón de tipo I (IFN) esté asociada con síntomas patológicos.

25 Se ha descubierto que las CDR del anticuerpo monoclonal murino anti-IFNAR-1 humano 64G12 pueden injertarse sobre las FR de una secuencia de anticuerpo humana para proporcionar anticuerpos humanizados y reactivos derivados de anticuerpo que tengan las propiedades de unión a antígeno del AcM anti-IFNAR-1 64G12 y una alta afinidad de unión a antígeno, al tiempo que presenten también una inducción reducida de HAMA y actividades efectoras aumentadas. Preferentemente, las secuencias de aminoácidos de región flanqueante humanas se seleccionan de modo que sea probable que el anticuerpo resultante sea adecuado para su administración *in vivo* en seres humanos. Esto puede determinarse, por ejemplo, basándose en el uso previo de anticuerpos que contienen dichas FR humanas. Preferentemente, las FR humanas no serán de por sí significativamente inmunogénicas.

30 En una realización, la presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen específicamente a IFNAR-1 y son capaces de bloquear la acción de interferones de tipo I. Preferentemente, dichos anticuerpos humanizados procederán de anticuerpos que tengan una buena afinidad de unión a IFNAR-1 y una buena actividad de bloqueo hacia todos los interferones de tipo I, tales como 64G12. Preferentemente, dichos anticuerpos humanizados procederán de 64G12, un anticuerpo murino del isotipo IgG, que se ha descrito que se une a IFNAR-1 con alta afinidad ( $K_D = 1,2 \times 10^{-9}$  M).

35 Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la presente invención se unirán al mismo epítipo que el 64G12. Dichos anticuerpos pueden identificarse basándose en su capacidad para competir con el 64G12 por la unión al IFNAR-1 o a células que expresan IFNAR-1. Se ha descubierto que el epítipo por el que se une el 64G12 incluye el péptido: CNFSSLKLNVEY (SEC ID N°: 42). Este péptido está en el subdominio 1 de la porción extracelular del IFNAR1. Las sustituciones específicas dentro de este péptido inhiben significativamente la unión de anticuerpo y también inhiben la unión y actividad de IFN de tipo I.

El anticuerpo monoclonal murino anti-IFNAR-1 64G12, y su producción, se han descrito anteriormente (Patente de Estados Unidos N° 5.919.453) y se ha depositado en la ECACC (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton Down Salisbury, Wiltshire SP4 056, Reino Unido) el 26 de febrero de 1992.

45 Como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos humanizados proporcionan ventajas potenciales sobre los anticuerpos murinos y también quiméricos, por ejemplo, una inmunogenicidad reducida en seres humanos. Esto es ventajoso porque debería reducir y, potencialmente eliminar, la generación de una respuesta HAMA cuando dichos anticuerpos humanizados se administran *in vivo*, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedad autoinmunes tales como LES, DMID, AR, etc. o para la prevención del rechazo de trasplantes o de la EICH. Además, dichos anticuerpos pueden presentar propiedades farmacocinéticas mejoradas.

50 El anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa que tenga cadenas pesadas y ligeras de longitud completa; un fragmento de la misma, tal como un fragmento Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub> o Fv; un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, un Fv de cadena sencilla, un monómero o dímero de cadena ligera o cadena pesada; proteínas de unión a antígeno mono específicas multivalentes que comprenden dos, tres, cuatro o más anticuerpos, o fragmentos de los mismos, unidos entre sí por una estructura de conexión; o un fragmento o análogo de cualquiera de estos o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el AcM 64G12. En una realización preferida, el anticuerpo comprende una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de toda la descripción detallada.

Las expresiones "receptor de interferón alfa 1", "IFNAR-1" y "antígeno de IFNAR-1" se usan indistintamente en el presente documento e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especie del IFNAR-1 humano. Por consiguiente, los anticuerpos humanos de la invención pueden, en ciertos casos, presentar reactividad cruzada con el IFNAR-1 de una especie distinta a la humana, o con otras proteínas que están estructuralmente relacionadas con el IFNAR-1 humano (por ejemplo, homólogos de IFNAR-1 humano). En otros casos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para el IFNAR-1 humano y no presentar reactividad cruzada de especie o de otro tipo.

El término "anticuerpo", como se denomina en el presente documento, incluye anticuerpos completos, incluyendo los de los isotipos IgG, IgM e IgA, y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadena sencilla del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada de IgG está compuesta por cuatro dominios,  $C_{H1}$ , bisagra,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas del extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras 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 (C1q) del sistema de complemento clásico.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IFNAR-1). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en 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 unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse usando procedimientos recombinantes mediante un engarce sintético que permite que se generen como una sola cadena proteica, en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242: 423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883), o mediante otros medios tales como el uso de enlaces disulfuro o a través de motivos de dimerización. Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden incluirse dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se exploran para determinar su utilidad de la misma forma que los anticuerpos intactos.

El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de una unión específica a un anticuerpo. Los epítopos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una sola especificidad de unión que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena ligera y un transgén de cadena pesada humana fusionados a una célula inmortalizada.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IFN-1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen

específicamente a antígenos distintos de IFNAR-1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de IFNAR-1 humano puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especie de IFNAR-1). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen especificidades diferentes están combinados en una composición bien definida.

Como se usa en el presente documento, una "unión específica" se refiere a la unión de anticuerpo a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une 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 al menos dos veces inferior a su  $K_D$  para la unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado, o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se usa en el presente documento, la expresión "alta afinidad" por un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-8}$  M o menos, más preferentemente de  $10^{-9}$  M o menos, e incluso más preferentemente de  $10^{-10}$  M o menos. Sin embargo, una unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, una unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos, más preferentemente  $10^{-8}$  M o menos.

El término " $K_{asoc}$ " o " $K_a$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción de antígeno-anticuerpo particular, mientras que el término " $K_{dis}$ " o " $K_d$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción de antígeno-anticuerpo particular. El término " $K_D$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación que se obtiene de la relación de  $K_d$  respecto a  $K_a$  (es decir,  $K_d/K_a$ ) y se expresa como concentración molar (M).

Como se usa en el presente documento, el término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgA o IgG) que está codificado por genes de la región constante de la cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el que la clase o isotipo de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a otras clases de Ig.

La expresión "de origen natural", como se usa en el presente documento según se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto pueda encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza, o que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

Las expresiones "no reordenado" o "configuración de línea germinal", como se usan en el presente documento en referencia a un segmento V, se refieren a la configuración en la que el segmento V no está recombinado para ser inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

Como se desvela y reivindica en el presente documento, las secuencias expuestas incluyen "modificaciones de secuencia conservativas", es decir, modificaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones de secuencia conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones por procedimientos convencionales conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han identificado en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. 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, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-IFNAR-1 humano se sustituye preferentemente con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales.

Para ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y se comparan de forma óptima, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos, habitualmente de al menos aproximadamente el 90 % al 95 %, y más preferentemente de al menos aproximadamente el 98 % al 99,5 % de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibriden en condiciones de



hibridación selectivas con la complementaria de la cadena.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología =  $n^{\circ}$  de posiciones idénticas/ $n^{\circ}$  total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que tienen que introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden efectuarse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación en los ejemplos no limitantes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando 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), usando una tabla de peso de restos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando 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>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención pueden usarse además como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y col. (1990) J. Mol. Bio 215: 403-10. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos en BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas en BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede usarse Gapped BLAST, como se describe en Altschul y col., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase la <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se ha vuelto sustancialmente puro" cuando se elimina por purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, separación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, y col., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácidos nucleicos de la presente invención, aunque con frecuencia en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), a partir de ADNc, genómico o mezclas de los mismos, pueden mutarse de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias de genes. Para las secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de secuencias nativas V, D, J, constantes, cambios y otras secuencias de este tipo descritas en el presente documento (en las que "derivadas" indica que una secuencia es idéntica a o está modificada a partir de otra secuencia).

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que están unidas están contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en fase de lectura. Para secuencias de cambio, unido operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar la recombinación de cambio.

El término "vector," como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de una 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 tras su introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de

expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven a funciones equivalentes.

- La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante.
- 5 Debería entenderse que dichos términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede de hecho no ser idéntica a la célula parental, pero todavía incluirse dentro del alcance de la expresión "célula huésped", como se usa en el presente documento. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, células CHO y células linfocíticas.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Se describen diversos aspectos de la invención en más detalle en las subsecciones siguientes.

#### Producción de anticuerpos humanizados contra IFNAR-1

- 15 Los presentes anticuerpos humanizados se producen por obtención de secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada variable ( $V_H$ ) y ligera variable ( $V_L$ ) de un anticuerpo que se une a IFNAR-1 (preferentemente 64G12), identificación de las CDR en dichas secuencias  $V_H$  y  $V_L$  e injerto de dichas secuencias de ácido nucleico codificantes de CDR sobre secuencias de ácido nucleico codificantes de regiones flanqueantes humanas seleccionadas. Se conocen bien en la técnica procedimientos para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican inmunoglobulinas.
- 20 Dichos procedimientos implicarán generalmente la amplificación de las secuencias codificantes de inmunoglobulina que se van a clonar usando cebadores apropiados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se han descrito en la bibliografía cebadores adecuados para amplificar secuencias de ácido nucleico de inmunoglobulina y, específicamente, secuencias pesadas variables y ligeras variables murinas. Después de haberse clonado dichas secuencias codificantes de inmunoglobulina, se secuenciarán por procedimientos bien conocidos en la técnica. Esto se efectuará para identificar las
- 25 secuencias codificantes de  $V_H$  y  $V_L$  y, más específicamente, las porciones de las mismas que codifican las CDR y FR. Esto puede efectuarse por procedimientos bien conocidos que incluyen, por ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.397 para Boss y col., y la Patente de Estados Unidos N° 5.225.539 para Winter.

- Una vez que se han identificado las secuencias de ADN que codifican las CDR y FR del anticuerpo que se va a humanizar, se identifican entonces las secuencias de aminoácidos que codifican las CDR (deducidas basándose en las secuencias de ácido nucleico y el código genético, y por comparación con secuencias de anticuerpo previas), y las secuencias de ácido nucleico codificantes de CDR se injertan sobre secuencias codificantes de FR humanas seleccionadas. Esto puede efectuarse mediante el uso de cebadores y engarces apropiados. Caen dentro del ámbito del experto en la materia los procedimientos para seleccionar cebadores y engarces adecuados para proporcionar la
- 30 ligación de secuencias de ácido nucleico deseadas.

- 35 Como se ha analizado anteriormente, las FR humanas seleccionadas usadas para la humanización serán preferentemente las que sea probable que sean adecuadas para su administración *in vivo*, es decir, que no sean inmunogénicas de por sí en seres humanos.

- Después de que las secuencias codificantes de CDR se injerten sobre las secuencias codificantes de FR humanas seleccionadas, las secuencias de ADN resultantes que codifican las secuencias pesada variable y ligera variable "humanizadas" se expresan entonces para producir un Fv humanizado o se unen a secuencias de región constante humana para producir un anticuerpo humanizado que se une a IFNAR-1. Normalmente, las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  humanizadas se expresarán como parte de una molécula de anticuerpo  $\alpha$ IFNAR-1 completa, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humanas cuyas secuencias de ADN codificante se han obtenido de una biblioteca disponible en el mercado o que se han obtenido usando, por ejemplo, uno de los
- 40 procedimientos descritos anteriormente para obtener secuencias de ADN. Los dominios variable de cadena ligera o pesada de la molécula de anticuerpo humanizada pueden fusionarse con dominios constantes de cadena ligera o pesada humanos, según sea apropiado, (la expresión "dominios constantes de cadena pesada", como se usa en el presente documento, debe entenderse que incluye regiones de bisagra a menos que se especifique otra cosa). Los dominios constantes humanos de la molécula de anticuerpo humanizada, cuando están presentes, pueden seleccionarse
- 45 teniendo en cuenta la función propuesta del anticuerpo, en particular la ausencia de funciones efectoras que puedan ser necesarias. Por ejemplo, los dominios constantes de cadena pesada fusionados con la región variable de cadena pesada pueden ser dominios de IgA, IgG o IgM humanos. Se usan preferiblemente dominios de IgG humanos. Los dominios constantes humanos de cadena ligera que pueden fusionarse con la región variable de cadena ligera incluyen cadenas lambda humanas o kappa humanas. Preferentemente se usan dominios de cadena kappa humana.

- 55 Como alternativa, pueden usarse ventajosamente análogos de dominios constantes humanos. Éstos incluyen los dominios constantes que contienen uno o más aminoácidos adicionales que el dominio humano correspondiente, o los dominios constantes en los que se han delecionado o alterado uno o más aminoácidos existentes del dominio humano correspondiente. Dichos dominios pueden obtenerse, por ejemplo, por mutagénesis dirigida con

oligonucleótidos. Sin embargo, las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  también pueden expresarse en ausencia de secuencias constantes para producir un  $\alpha$ IFNAR-1 Fv humanizado. No obstante, la fusión de secuencias constantes humanas es potencialmente deseable porque el anticuerpo  $\alpha$ IFNAR-1 humanizado resultante puede tener un perfil farmacocinético sustancialmente mejorado. Los procedimientos para sintetizar ADN que codifica una proteína de secuencia conocida son bien conocidos en la técnica. Usando dichos procedimientos, se sintetizan secuencias de ADN que codifican las secuencias  $V_L$  y  $V_H$  humanizadas objeto (con o sin regiones constantes), y después se expresan en un sistema de vector adecuado para la expresión de anticuerpos recombinantes. Esto puede efectuarse en cualquier sistema de vector que permita que las secuencias  $V_L$  y  $V_H$  humanizadas objeto se expresen como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano y se asocien para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (de unión a antígeno) funcionales. Se exponen procedimientos útiles, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.397 para Boss y col. y la Patente de Estados Unidos N° 5.225.539 para Winter.

Se conocen bien en la técnica vectores de expresión y células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos recombinantes y anticuerpos humanizados en particular. Las referencias siguientes son representativas de procedimientos y vectores adecuados para la expresión de inmunoglobulinas recombinantes que pueden usarse para llevar a cabo la presente invención: Weidle y col., *Gene*, 51: 21-29 (1987); Dorai y col., *J. Immunol.*, 13(12): 4232-4241 (1987); De Waele y col., *Eur. J. Biochem.*, 176: 287-295 (1988); Colcher y col., *Cancer Res.*, 49: 1738-1745 (1989); Wood y col., *J. Immunol.*, 145(9): 3011-3016 (1990); Bulens y col., *Eur. J. Biochem.*, 195: 235-242 (1991); Beldsington y col., *Biol. Technology*, 10: 169 (1992); King y col., *Biochem. J.*, 281: 317-323 (1992); Page y col., *Biol. Technology*, 9: 64 (1991); King y col., *Biochem. J.*, 290: 723-729 (1993); Chaudhary y col., *Nature*, 339: 394-397 (1989); Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44: 65-92 (1989); Benhar y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12051-12055 (1994); Singer y col., *J. Immunol.*, 150: 2844-2857 (1993); Couto y col., *Hybridoma*, 13(3): 215-219 (1994); Queen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10029-10033 (1989); Caron y col., *Cancer Res.*, 52: 6761-6767 (1992); Coloura y col., *J. Immunol. Meth.*, 152: 89-109 (1992). Además, están disponibles en el mercado vectores adecuados para la expresión de anticuerpos recombinantes. El vector puede, por ejemplo, ser un segmento de ácido nucleico desnudo, un segmento de ácido nucleico asociado a vehículo, una nucleoproteína, un plásmido, un virus, un viroide o un elemento transponible.

Células huésped que se sabe que son capaces de expresar inmunoglobulinas funcionales incluyen, por ejemplo: células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO); células COS; células de mieloma, tales como células NSO y SP2/0, bacterias tales como *Escherichia coli*; células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*; y otras células huésped. De éstas, muchos investigadores usan células CHO dada su capacidad para expresar y secretar eficazmente inmunoglobulinas. Las células NSO son uno de los tipos preferidos de células huésped útiles en la presente invención.

Esencialmente, la expresión recombinante de anticuerpos humanizados se obtiene por uno de dos procedimientos generales. En el primer procedimiento, las células huésped se transfectan con un solo vector que proporciona la expresión de secuencias variables tanto  $V_H$  como  $V_L$ , opcionalmente fusionadas con regiones constantes seleccionadas. En el segundo procedimiento, las células huésped se transfectan con dos vectores, cada uno de los cuales proporciona la expresión de la secuencia  $V_H$  o  $V_L$ , cada una opcionalmente fusionada con una región constante seleccionada.

Se conocen bien en la técnica secuencias de dominio constante humanas y se han descrito en la bibliografía. Las secuencias de cadena ligera constante ( $C_L$ ) humanas preferidas incluyen las secuencias ligeras constantes kappa y lambda. Las secuencias de cadena pesada constante humanas preferidas incluyen gamma 1 humana, gamma 2 humana, gamma 3 humana, gamma 4 humana y versiones mutadas de las mismas, que proporcionan un efecto o función alterada, por ejemplo, una semivida *in vivo* aumentada, una unión a receptor de Fc reducida y similares.

Después de la expresión, la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo humanizado resultante se ensayará por procedimientos conocidos, por ejemplo, análisis de Scatchard. Idealmente, la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo humanizado se aproximará a la del anticuerpo precursor, por ejemplo, 64G12, o conservará al menos el 50 % de la afinidad de unión del anticuerpo precursor (es decir, el anticuerpo que donó las CDR).

Un anticuerpo puede humanizarse por cualquier procedimiento que sea capaz de sustituir al menos una porción de una CDR de un anticuerpo humano con una CDR derivada de un anticuerpo no humano. Winter describe un procedimiento que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (Solicitud de Patente del Reino Unido GB 2188638A, presentada el 26 de marzo de 1987). Las CDR humanas pueden sustituirse con CDR de ratón, por ejemplo usando mutagénesis dirigida con oligonucleótidos, como se describe en la Solicitud Internacional WO 94/10332 titulada *Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes*.

También están dentro del alcance de la invención anticuerpos humanizados en los que se han sustituido, delecionado o añadido aminoácidos específicos. Los anticuerpos humanizados tienen sustituciones de aminoácidos en la región flanqueante, tal como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, en un anticuerpo humanizado que tiene CDR de ratón, los aminoácidos localizados en la región flanqueante humana pueden sustituirse con los aminoácidos localizados en las posiciones correspondientes en el anticuerpo de ratón. Se sabe que dichas sustituciones mejoran la unión de anticuerpos humanizados al antígeno en algunos casos. Los anticuerpos en los

que se han añadido, delecionado o sustituido aminoácidos se denominan en el presente documento anticuerpos modificados o anticuerpos alterados.

Los anticuerpos humanizados variantes y/o equivalentes pueden contener, por ejemplo, sustituciones conservativas, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Se conoce bien en la técnica lo que se pretende mediante una sustitución de aminoácido conservativa.

La expresión “sustancialmente homóloga” se usa en relación con la similitud de una secuencia de aminoácidos objeto (de un oligo- o poli-péptido o proteína) con una secuencia de aminoácidos de referencia relacionada. Esta expresión se define como una “correspondencia” de al menos aproximadamente el 75 % —es decir, el estado de restos de aminoácidos idénticos que se sitúan en paralelo— entre las secuencias objeto y de referencia cuando esas secuencias están en un “alineamiento”, es decir, cuando se ha insertado un número mínimo de bases “nulas” en las secuencias objeto y/o de referencia para maximizar el número de bases existentes en correspondencia entre las secuencias. Las bases “nulas” no son parte de las secuencias objeto y de referencia; además, el número mínimo de bases “nulas” insertadas en la secuencia objeto puede diferir del número mínimo insertado en la secuencia de referencia. En esta definición, una secuencia de referencia se considera “relacionada” con una secuencia objeto cuando ambas secuencias de aminoácidos componen proteínas o porciones de proteínas que son anticuerpos  $\alpha$ IFNAR-1 o fragmentos de anticuerpo con la afinidad de unión de  $\alpha$ IFNAR-1. Cada una de las proteínas que comprenden estos anticuerpos  $\alpha$ IFNAR-1 o fragmentos de anticuerpo pueden ser independientemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o proteínas bi- o multifuncionales, por ejemplo, tales como proteínas de fusión, anticuerpos bi- y multiespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla y similares.

Un experto en la materia será capaz (mediante una experimentación de rutina) de determinar qué cantidad de anticuerpo sería eficaz y no tóxica con el fin de tratar enfermedades autoinmunes o para la prevención del rechazo de trasplantes. Generalmente, sin embargo, una dosificación eficaz estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal al día.

Los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo humanizados de la invención pueden administrarse a un sujeto en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada por combinación del anticuerpo de la invención con un vehículo, diluyente y/o excipiente convencional farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas conocidas. Un experto en la materia reconocerá que la forma y el carácter del vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable vienen dictados por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas.

La vía de administración de los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Las formas de administración parenteral subcutánea, intravenosa e intramuscular se prefieren generalmente.

#### Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales humanizados contra IFNAR-1

También pueden producirse anticuerpos humanizados de la invención en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección génica, como se conocen bien en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse ADN que codifiquen cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa por técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación por PCR, mutagénesis dirigida) y pueden insertarse en vectores de expresión de modo que los genes se unan operativamente a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, la expresión “unido operativamente” pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción dentro del vector sirven a su función deseada de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por procedimientos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado, de modo que el segmento  $V_H$  se una operativamente al segmento o segmentos  $C_H$  dentro del vector, y el segmento  $V_L$  se una operativamente al segmento  $C_L$  dentro del vector. Además, o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido

señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en fase de lectura al extremo amino-terminal 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 distinta de inmunoglobulina).

5 Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression  
10 Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de los simios 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de  $\beta$ -globina.

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 regulen la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup>: 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel y col.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).  
20  
25

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula huésped por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden incluir una amplia diversidad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares.  
30

Células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células 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, usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NS0, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo hacia el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales.  
35  
40

#### 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 humanizados, o una porción o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos humanizados de la invención.  
45

En una realización, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende una combinación de anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados que se unen a diferentes epítopos en el IFNAR-1 humano y tienen actividades complementarias, por ejemplo, como una composición farmacéutica. Además, un anticuerpo humanizado de la invención puede conjugarse con un agente terapéutico, tal como una toxina o radiomarcador, para formar un inmunoconjugado, o puede unirse a uno o más anticuerpos adicionales para formar una molécula biespecífica (o multiespecífica). En otra realización, la composición terapéutica comprende uno o una combinación de inmunoconjugados o moléculas biespecíficas (o multiespecíficas) de la invención.  
50  
55

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 puede incluir una composición de la presente invención con al menos otra terapia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidémica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede revertirse en un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar al compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición de la presente invención puede administrarse por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto frente a una liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen en general por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración puede ser necesario revestir el compuesto o coadministrarlo con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones acuosas de tampón. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan y col. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o de dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente 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, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse por incorporación del compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sean necesarios, seguida de microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan por incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de

dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario.

5 Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención vienen dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a conseguir y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de la preparación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

10 Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

15 Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto a tratar y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una sola forma de dosificación generalmente será esa cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento.

25 Las expresiones “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral”, como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

30 Las vías de administración preferidas para las composiciones de anticuerpos de la invención son por vía intravenosa, intramuscular e intraperitoneal. Los modos de administración preferidos son por inyección e infusión.

35 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

40 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, véase anteriormente, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Cuando los compuestos de la presente invención se administran como agentes farmacéuticos, por ejemplo, a seres humanos o animales, pueden administrarse en solitario o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,01 al 99,5 % (más preferentemente, del 0,1 al 90 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

55 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular

que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

5 Un médico o veterinario experto en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado, y gradualmente aumentar la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será esa cantidad del compuesto que sea la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá  
10 generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, administrada preferentemente próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre en solitario, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).  
15

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de  
20 implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar una medicación a una velocidad controlada; la Patente de Estados Unidos N° 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente de Estados Unidos N° 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para administrar una medicación a una velocidad de infusión precisa; la Patente de Estados Unidos  
25 N° 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la Patente de Estados Unidos N° 4.439.196, que desvela un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos multicámara; y la Patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que desvela un sistema de administración de fármaco osmótico. Los expertos en la materia conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanizados de la invención pueden formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesen la BHE (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transporten selectivamente en células u órganos específicos, mejorando por lo tanto la administración de fármaco dirigida (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.416.016 para Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe y col. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134), pudiendo las formulaciones de las invenciones comprender diferentes especies de los mismos, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de dirección. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran por inyección en embolada en un sitio deseado. La composición debe ser fluida en la medida en que exista una fácil aplicación mediante jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.  
45

50 Un "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente la actividad biológica de interferones de Tipo I en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, aún más preferentemente en al menos aproximadamente el 60 % y, aún más preferentemente, en al menos aproximadamente el 80 % respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir la actividad biológica de interferones de Tipo I puede evaluarse en un sistema de modelo animal, tal como los descritos en los Ejemplos u otros sistemas de modelo conocidos en la técnica que son predictivos de la eficacia en afecciones humanas asociadas con una actividad aberrante de interferón de Tipo I. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir la actividad biológica de interferones de Tipo I. Dicha inhibición puede determinarse usando ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la materia, incluyendo, pero sin limitación, los ensayos *in vitro* descritos en los Ejemplos. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede inhibir la actividad de interferón de Tipo I de modo que se mejoren los síntomas de una enfermedad o trastorno mediado, al menos en parte, por una expresión o actividad aberrante de interferón de Tipo I. Dichas enfermedades y trastornos incluyen enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes y EICH. Un experto en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores  
60



tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición pueda administrarse mediante jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, por mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es más preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol y cloruro sódico en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina. Cuando el compuesto activo está convenientemente protegido, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

#### Usos y procedimientos de la invención

Los anticuerpos monoclonales anti-IFNAR-1 humanizados de la presente invención tienen diversas utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Como alternativa, pueden prepararse como medicamentos y composiciones para tratar, prevenir o diagnosticar diversos trastornos en los que el interferón de tipo I desempeña un papel. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir tanto seres humanos como animales no humanos. La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Las composiciones de anticuerpos de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria del intestino (EII; incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celiaca), diabetes mellitus insulina-dependiente (DMID) y artritis reumatoide (AR). Además, las composiciones de anticuerpo de la invención pueden usarse para inhibir o prevenir el rechazo de trasplantes o en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Se describen en detalle usos de las composiciones de anticuerpos de la invención para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino en la solicitud de patente de Estados Unidos en copropiedad titulada "Compositions and Methods for the Therapy of Inflammatory Bowel Disease", que tiene el N° de Serie de Estados Unidos 60/465.155, presentada el 23 de abril de 2003.

Los anticuerpos humanos de la invención pueden ensayarse inicialmente para determinar su actividad de unión asociada con el uso terapéutico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse usando ensayos de Biacore y citometría de flujo descritos en los Ejemplos a continuación. Se conocen bien en la técnica procedimientos adecuados para administrar anticuerpos y composiciones de la presente invención. Las dosificaciones adecuadas también pueden determinarse dentro de la especialidad en la técnica y dependerán de la edad y del peso del sujeto y del fármaco particular usado.

Los anticuerpos anti-IFNAR-1 humanos de la invención también pueden coadministrarse con otros agentes terapéuticos que se han descrito anteriormente.

Se prefieren preparaciones farmacéuticas para administración parenteral, tal como se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, 5 Pa., 1989. Las preparaciones finales contienen del 0,01 % al 50 % de principios activos. Se proporcionan procedimientos para la producción de dichos conjugados y su uso en el diagnóstico y la terapéutica en, por ejemplo, Shih y col., Patente de Estados Unidos N° 5.057.313; Shih y col., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); N° de Serie de Estados Unidos de propiedad común en trámite junto con la presente 08/162.912; y McKearn y col., Patente de Estados Unidos N° 5.156.840.

Como se ha señalado anteriormente, con el fin de la terapia, puede administrarse una composición de anticuerpo humanizado y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una composición de anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz 15" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es "fisiológicamente significativo" si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente destinatario. Un agente terapéutico diana es "terapéuticamente eficaz" si administra una mayor proporción de la dosis administrada en la diana deseada que la que se acumula en la diana tras la administración sistémica del agente no dirigido equivalente.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que no deberían interpretarse como adicionalmente limitantes.

#### **Ejemplo 1: Producción de anticuerpos humanizados específicos para IFNAR-1**

La fuente de las CDR de donador usadas para preparar el anticuerpo humanizado fue un anticuerpo monoclonal murino, 64G12, que es específico para IFNAR-1 (Patente de Estados Unidos N° 5.919.453). Se estableció

previamente una línea celular de hibridoma 64G12.

Clonación de regiones variables de 64G12

Se extrajo ARNm del hibridoma 64G12 usando el kit de minipreparaciones de ARNm Oligotex de Qiagen y el ADNc posterior se sintetizó usando un kit de amplificación de ADNc 5 Marathon de Clontech. Las regiones variables para las cadenas pesadas de 64G12 se amplificaron con HotStar Taq de Qiagen usando cebadores contra el gen de IgG1 murino (Directo: ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG (SEC ID N°: 43) e Inverso: CAGTGGATAGACAGATGGGG) (SEC ID N°: 44), aunque las cadenas ligeras se amplificaron usando cebadores contra el gen kappa murino 10 (ACTGGATGGTGGGAAGATGG) (SEC ID N°: 45) y la secuencia de aminoácidos N-terminal (CTCACCCAGTCTCCAACCACCATGGCTGCATC) (SEC ID N°: 46). La identidad de las cadenas se confirmó por comparación de la secuencia peptídica del extremo N-terminal del anticuerpo 64G12 con la secuencia proteica traducida a partir de los clones de ADNc.

15 Construcción de regiones variables

A partir de las secuencias de los dominios VH y VL de 64G12, las secuencias de CDR se determinaron con respecto a la base de datos de Kabat y col. ("Sequences of Proteins of 20 Immunological Interest" US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office) y usando un alineamiento asistido por ordenador con otras secuencias VH y VL. La secuencia VH se muestra en la SEC ID N°: 7. La secuencia VL se muestra en la SEC ID N°: 19. Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de los dominios VH y VL se muestran en la Tabla 1 a continuación.

**Tabla 1**

SEC ID N°:	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
1	TSGMGIG	CDR1 de V <sub>H</sub> de 64G12
2	HIWWDDDKYYNPSLKS	CDR2 de V <sub>H</sub> de 64G12
3	NYYPYDAWFDY	CDR3 de V <sub>H</sub> de 64G12
4	SASSINSNHLH	CDR1 de V <sub>L</sub> de 64G12
5	RTSILAS	CDR2 de V <sub>L</sub> de 64G12
6	QQGSNIPFT	CDR3 de V <sub>L</sub> de 64G12

20 Las regiones variables murinas se amplificaron a partir de los moldes mencionados anteriormente usando cebadores con los sitios de restricción que permitían la subclonación en fase de lectura en los vectores de expresión de mamífero de los presentes inventores.

La primera serie de ADN de región variable humana la sintetizó Operon. Se crearon anticuerpos desimmunizados posteriores con el kit de mutagénesis dirigida QuikChange de Stratagene.

25 Expresión de anticuerpos de longitud completa

Todas las secuencias de región variable pesada y ligera (murina y humana) se subclonaron en fase de lectura con las regiones constantes de IgG humana en los vectores de expresión de mamífero de Invitrogen pcDNA3.1/neo y pcDNA3.1/hygro respectivamente. Se usó la secuencia señal de osteonectina humana en lugar de la secuencia de IgG endógena para secretar los anticuerpos recombinantes. Además, los RNP UCOE de 4,2 kb (Benton y col., Cytotechnology, 38: 43-46,2002) se insertaron cadena arriba de los promotores de CMV para mantener la cromatina abierta y permitir la generación rápida de células que expresan altos niveles de anticuerpos.

Para transfecciones transitorias, células 293 humanas se cotransfectaron con plásmidos que llevaban tanto cadena pesada como ligera usando FuGENE 6 de Roche. Los sobrenadantes se recogieron 3-4 días post-transfección y los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de proteína A-sepharose.

35 Para la expresión estable, células CHO-S se cotransfectaron con plásmidos linealizados que llevaban tanto cadena pesada como ligera usando DMRIE-C de Invitrogen. Se seleccionaron células transfectadas de forma estable por adición de Geneticina e Higromicina B a 500 ug/ml al medio de cultivo. Las células secretoras de anticuerpos se expandieron y el anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo por cromatografía de afinidad de proteína A, como se ha descrito por Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

40 La transferencia de las CDR del 64G12 murino a regiones flanqueantes humanas se consiguió por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos, como se describe por Nakamye y col. (Nucleic Acids Res 14, 9679-9687 (1986)). Los

## ES 2 368 737 T3

moldes de ADN usados para la mutagénesis de VH comprendían regiones flanqueantes humanas de las secuencias de línea germinal humanas DP-26, DP-47 y DPK26, de la forma siguiente:

- 5 (DP-26) (Genbank: HSIKDP26) QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIF  
SNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYY (SEC ID N°: 47),  
(DP-47) (Genbank: HSIKDP47) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA  
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEC ID N°: 48), y  
(DPK26) (Genbank: HSIKDPK26) EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIK  
YASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP (SEC ID N°: 49).

10 Además, en ciertas construcciones, se realizaron sustituciones adicionales en restos de CDR y/o FR con el fin de aumentar la afinidad de unión o disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo (analizado adicionalmente a continuación).

15 En resumen, se generaron una serie de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo humanizadas que comprendían las secuencias siguientes. Las secuencias de aminoácidos de estas regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo se muestran en las Figuras 1B-1L y 2B-2S, junto con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del 64G12 murino donador (la secuencia de VH de 64G12 es la SEC ID N°: 7 de la Figura 1A y la secuencia de VL de 64G12 es la SEC ID N°: 19 de la Figura 2A).

La secuencia de cadena pesada H2 se diseñó por combinación de las CDR de VH de 64G12 con la secuencia de región flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-28 (SEC ID N°: 8 de la Figura 1B).

20 La secuencia de cadena pesada H2-C3 se diseñó por combinación únicamente de la CDR3 de VH de 64G12 con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-28 (SEC ID N°: 9 de la Figura 1C).

La secuencia de cadena pesada H3 se diseñó por combinación de las CDR de VH de 64G12 con una secuencia flanqueante de cadena pesada de inmunoglobulina humana de consenso (SEC ID N°: 10 de la Figura 1D).

25 La secuencia de cadena pesada M3 se diseñó por combinación de las CDR de VH de 64G12 con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-47 (SEC ID N°: 11 de la Figura 1E).

30 La secuencia de cadena pesada M3-4 se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que la posición 4 de la CDR3 se sustituyó con uno de los aminoácidos siguientes: L, N, E, V, A, C, G, S, R, D, M, H, T, W, K o I (SEC ID N°: 12 de la Figura 1F).

La secuencia de cadena pesada M3-11 se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que la posición 11 de la CDR3 se sustituyó con uno de los aminoácidos siguientes: L, E, Q, R, V, A, F, G, C, T, W, H, K, D, S o I (SEC ID N°: 13 de la Figura 1G).

35 La secuencia de cadena pesada M3-A se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que se eliminó un epítipo de células T por sustitución del aminoácido en la posición 4 de la CDR1 (una metionina) con una alanina (SEC ID N°: 14 de la Figura 1H).

La secuencia de cadena pesada M3-B se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que se eliminó un epítipo de células T por sustitución del aminoácido en la posición 16 de la CDR2 (una serina) con una alanina (SEC ID N°: 15 de la Figura 1I).

40 La secuencia de cadena pesada M3-A/B se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que se incorporaron tanto las sustituciones de M3-A como de M3-B en la secuencia (SEC ID N°: 16 de la Figura 1J).

La secuencia de cadena pesada DI M3 se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que todos sus epítopos de células T potenciales se eliminaron haciendo sustituciones en seis restos de la región flanqueante (SEC ID N°: 17 de la Figura 1K).

45 La secuencia de cadena pesada DI M3-B se diseñó a partir de la secuencia M3, en la que las sustituciones de región flanqueante de la secuencia de DI M3 y la sustitución de la CDR2 de la secuencia M3-B se combinaron (SEC ID N°: 18 de la Figura 1L).

50 La secuencia de cadena ligera K6 se diseñó por combinación de las CDR de VL de 64G12 con la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena ligera de inmunoglobulina humana DPK-26 (SEC ID N°: 20 de la Figura 2B).

La secuencia de cadena ligera K1 se diseñó por combinación de las CDR de VH de 64G12 con una secuencia flanqueante de cadena ligera de inmunoglobulina humana de consenso (SEC ID N°: 21 de la Figura 2C).

La secuencia de cadena ligera K1-C se diseñó a partir de la secuencia K1, en la que uno de sus epítomos de células T potenciales se eliminó por sustitución de la posición 4 de la CDR1 (una serina) con una treonina (SEC ID N°: 22 de la Figura 2D).

5 La secuencia de cadena ligera K1-D se diseñó a partir de la secuencia K1, en la que uno de sus epítomos de células T potenciales se eliminó por sustitución de la posición 12 de la CDR1 (una histidina) con una asparagina (SEC ID N°: 23 de la Figura 2E).

La secuencia de cadena ligera K1-E se diseñó a partir de la secuencia K1, en la que uno de sus epítomos de células T potenciales se eliminó por sustitución de la posición 3 de la CDR3 (una glicina) con una treonina (SEC ID N°: 24 de la Figura 2F).

10 Las secuencias de cadena ligera K1-C/D, K1-C/E, K1-D/E y K1-C/D/ se diseñaron a partir de la secuencia K1, en la que las sustituciones de K1-C y K1-D, las sustituciones de K1-C y K1-E, las sustituciones de K1-D y K1-E y las sustituciones de K1-C, K1-D y K1-E se combinaron, respectivamente (SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27 y SEC ID N°: 28, respectivamente, de las Figuras 2G, 2H, 2I y 2J).

15 La secuencia de cadena ligera DI K1 se diseñó a partir de la secuencia K1, en la que todos sus epítomos de células T potenciales se eliminaron haciendo sustituciones en seis restos de región flanqueante (SEC ID N°: 29 de la Figura 2K).

La secuencia de cadena ligera DI K1-C se diseñó a partir de la secuencia K1, combinando las sustituciones de región flanqueante de D1 K1 con la sustitución en la CDR1 de K1-C (SEC ID N°: 30 de la Figura 2L).

20 La secuencia de cadena ligera DI K1-DS se diseñó a partir de la secuencia K1, en la que se eliminaron cinco de los seis epítomos de células T potenciales haciendo sustituciones en cinco restos de región flanqueante (SEC ID N°: 31 de la Figura 2M).

La secuencia de cadena ligera DI K1-C-DS se diseñó a partir de la secuencia K1, en la que se combinaron las sustituciones de DI K1-DS y la sustitución de K1-C (SEC ID N°: 32 de la Figura 2N).

25 Las secuencias de cadena ligera DI K1-A19V, DI K1-L37Q, DI K1-A46L, DI K1-I58V y DI K1-T83F se diseñaron a partir de la secuencia K1, en la que se eliminaron cinco de los seis epítomos de células T potenciales cambiando los aminoácidos resaltados en la región flanqueante como se muestra en las SEC ID N°: 33, SEC ID N°: 34, SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36 y SEC ID N°: 37 de las Figuras 2O, 2P, 2Q, 2R y 2S, respectivamente.

Las Figuras 3A-3D muestran las secuencias de ácido nucleico de las regiones variables de cadena pesada M3 (FIG. 3A) y DI M3-B (FIG. 3C) y de las regiones variables de cadena ligera K1 (FIG. 3B) y K1-C (FIG. 3D).

30 **Ejemplo 2: Análisis de Biacore de ciertos emparejamientos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> humanizados**

Se produjeron una serie de emparejamientos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpos humanizados y se compararon con el anticuerpo murino original, así como con un anticuerpo quimérico de ratón-humano que contenía las regiones variables murinas de 64G12 y las regiones constantes kappa de IgG4 humana. Se expresaron las cadenas pesadas humanas H2 y H3 en combinación con las cadenas ligeras humanas K1 y K6 para generar los anticuerpos H2K6, H2K1, H3K6 y H3K1. Las secuencias de aminoácidos de estas regiones variables se muestran en las Figuras 1B, 1D, 2B y 2C.

40 Se ensayaron los anticuerpos de los clones 64G12, H2K6, H2K1, H3K6 y H3K1 mediante análisis de Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suecia) para determinar la cinética de unión. El fragmento extracelular de IFNAR-1 recombinante purificado se acopló a la microplaca detectora CM5 a 600 UR. La unión se midió por adición de anticuerpo a concentraciones de 1,75-80 nM a un caudal de 20 ul/min. Las curvas de unión se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir usando el software BIAevaluation (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Los valores de K<sub>D</sub> determinados se muestran en la Tabla 2:

**Tabla 2**

Anticuerpo	K <sub>D</sub> (M)
64G12 (IgG1 de ratón)	1,2 x 10 <sup>-9</sup>
IgG4 quimérica	3,6 x 10 <sup>-9</sup>
H2K6	1,3 x 10 <sup>-9</sup>
H2K1	0,8 x 10 <sup>-9</sup>
H3K6	1,8 x 10 <sup>-9</sup>
H3K1	3,4 x 10 <sup>-9</sup>

45 Se determinó que la afinidad de unión del patrón de anticuerpo murino y del anticuerpo quimérico de IgG4 humana estaba en el intervalo de 1,2-3,6 nM usando este ensayo. Todas las combinaciones de anticuerpos humanizados condujeron a anticuerpos con alta afinidad de unión a IFNAR-1, indistinguible del anticuerpo quimérico y del

anticuerpo derivado del hibridoma murino original 64G12.

Una cadena pesada alternativa denominada H2-C3 (SEC ID N°: 9 de la Figura 1C), en la que sólo se conservó la CDR3 del anticuerpo murino, se expresó también en combinación con la cadena ligera K6, pero el anticuerpo producido no era capaz de unirse a IFNAR-1.

- 5 Otra cadena pesada humanizada denominada M3 (SEC ID N°: 11 de la Figura 1E, que comprende la secuencia flanqueante de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina humana DP-47) se coexpresó con la cadena ligera K1, y también dio como resultado un anticuerpo capaz de una unión de alta afinidad a IFNAR-1. La afinidad de unión se determinó usando un ensayo de captura en el que se inmovilizó Fc anti-IgG humana en una microplaca de Biacore, los anticuerpos humanos anti-IFNAR-1 se capturaron haciéndolos pasar sobre la superficie de Fc anti-IgG humana, y después se midió la unión de IFNAR-1 soluble a concentraciones de 25-400 nM para permitir que se calculase la afinidad de unión. La afinidad de unión de M3K1 se comparó con la de H3K1. Los resultados se muestran en la Tabla 3:

**Tabla 3**

	<b>ka (1/Ms)</b>	<b>kd (1/s)</b>	<b>K<sub>D</sub> (M)</b>
<b>HK31</b>	8,06E+03	5,04E-05	6,26E-09
<b>MK31</b>	5,34E+03	3,79E-05	7,09E-09
Celda de flujo 2-1, captura de baja densidad			
	<b>ka (1/Ms)</b>	<b>kd (1/s)</b>	<b>K<sub>D</sub> (M)</b>
<b>HK31</b>	7,48E+03	4,81E-05	6,43E-09
<b>MK31</b>	5,49E+03	4,39E-05	7,99E-09
Celda de flujo 4-3, captura de mayor densidad			

### **Ejemplo 3: Desinmunización de secuencias de anticuerpo seleccionadas**

- 15 Las secuencias VH y VK de H3K1 se analizaron usando un programa Peptide Threading (Biovation, Inc.). En resumen, las secuencias de aminoácidos se dividen en las 13 unidades posibles. Los péptidos de 13 unidades se presentan de forma secuencial a los módulos de la hendidura de unión de los alotipos HLA-DR y se asigna una puntuación de unión a cada péptido para cada alelo. Se calcula una puntuación conformacional para cada cadena lateral unida a bolsillo del péptido. Esta puntuación se basa en la superposición estérica, enlaces de hidrógeno potenciales entre el péptido y restos en la hendidura de unión, interacciones electrostáticas y contactos favorables entre el péptido y los restos del bolsillo. La conformación de cada cadena lateral se altera después y se recalcula la puntuación.

- 25 Los epítomos de células T potenciales se eliminan realizando sustituciones de aminoácidos en el péptido particular que constituye el epítomo. Se realizaron sustituciones por inserción de aminoácidos de propiedades físico-químicas similares si era posible. Sin embargo, para eliminar algunos epítomos potenciales, puede ser necesario sustituir aminoácidos de diferente tamaño, carga o hidrofobicidad. La numeración de los restos de aminoácidos para su sustitución es según Kabat (Kabat y col., 1991). Las sustituciones de aminoácidos se resumen y se ilustran en las Figuras 1H-1L y 2D-2S.

- 30 Se construye una serie de anticuerpos con un número reducido de epítomos de células T potenciales. Éstos incluyen las variantes de cadena pesada M3-A y M3-B, en las que se cambiaron restos en las regiones CDR, y DI M3, en la que se alteraron restos de región flanqueante. También se construyeron cadenas ligeras desinmunizadas denominadas K1-C, K1-D, K1-E y DI K1. Estas regiones V desinmunizadas se expresaron como anticuerpos IgG4 humanos en diversas combinaciones como se muestra en la Tabla 4. Los anticuerpos se expresaron y se purificaron antes del análisis por Biacore. Se usó una microplaca de Biacore con IFNAR-1 revestido sobre la celda de flujo 2 a 690 UR y Fc anti-IgG humana sobre la celda de flujo 4 a 5000 UR. La unión del anticuerpo a IFNAR-1 respecto al Fc anti-IgG humana se determinó por la relación de la respuesta en la celda de flujo 2 dividida por la celda de flujo 4 (Fc2/Fc4). Varias variantes conservaban una alta actividad de unión a IFNAR-1 en comparación con el patrón H3K1, como se muestra también en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Cadena pesada		Cadena Ligera		Fc2/Fc4	% de actividad respecto a H3K1
Nombre	SEC ID N°:	Nombre	SEC ID N°:		
H3	10	K1	21	0,30	100
M3	11	K1	21	0,42	140
DI M3	17	K1	21	0,41	137
M3	11	DIK1	29	0,17	57
DI M3	17	DIK1	29	0,06	20
M3-A	14	K1	21	0,05	17
M3-B	15	K1	21	0,31	103
M3-AB	16	K1	21	0,13	43
M3	11	K1-C	22	0,29	97
M3	11	K1-D	23	0,09	30
M3	11	K1-E	24	-0,05	-
M3	11	K1-CD	25	0,17	57
M3	11	K1-CDE	28	-01,0	-
M3	11	K1-DE	27	-0,10	-
M3-AB	16	K1-CD	25	0,07	23

También se generaron variantes de combinación adicionales de cadena pesada DI M3-B y cadena ligera DI K1-C. Estas variantes de combinación se ensayaron también para determinar su unión a IFNAR-1. Los resultados demostraron que, aunque se conservaba una alta afinidad de unión con la cadena pesada DI M3-B, el uso de la cadena ligera DI K1-C daba como resultado una actividad de unión reducida similar a la observada con la cadena ligera DI K1. Los resultados se muestran en la Tabla 5. El análisis de unión se realizó por Biacore, con el anticuerpo unido a IFNAR-1 soluble inmovilizado. Se determinó la respuesta máxima a dos concentraciones y los valores mostrados son la media de cuatro determinaciones.

5

**Tabla 5**

Cadena pesada		Cadena Ligera		% de respuesta respecto a H3K1
Nombre	SEC ID N°:	Nombre	SEC ID N°:	
H3	10	K1	21	100
M3	11	K1	21	97
M3-B	15	K1	21	117
DI M3	17	K1	21	149
DI M3-B	18	K1	21	122
M3	11	K1-C	22	100
M3-B	15	K1-C	22	156
DI M3	17	K1-C	22	96
DI M3-B	18	K1-C	22	100

10

(cont)

Cadena pesada		Cadena Ligera		% de respuesta respecto a H3K1
Nombre	SEC ID N°:	Nombre	SEC ID N°:	
M3	11	DIK1	29	25
M3-B	15	DIK1	29	17
DI M3	17	DIK1	29	8
DI M3-B	18	DI K1	29	11
M3	11	DIK1-C	30	17
M3-B	15	DI K1-C	30	14
DI M3	17	DIK1-C	30	4
DI M3-B	18	DI K1-C	30	9

Para caracterizar adicionalmente las variantes seleccionadas se determinó su afinidad usando el ensayo de captura de anticuerpo (en el que se unió Fc anti-IgG humana a la microplaca de Biacore y se usó IFNAR-1 soluble a 25-400 nM). Los resultados se muestran en la Tabla 6 y demuestran que se observaba una alta afinidad de unión a IFNAR con estas variantes.

5

**Tabla 6**

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	R <sub>máx</sub> Ac
<b>M3K1</b>	5,34E+03	3,79E-05	7,09E-09	528
<b>M3-B K1</b>	5,49E+03	4,10E-05	7,47E-09	520
<b>DIM3-B K1</b>	5,61E+03	2,82E-06	5,02E-10	479
Celda de flujo 2-1, captura de baja densidad				
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	R <sub>máx</sub> Ac
<b>M3K1</b>	5,49E+03	4,39E-05	7,99E-09	924
<b>M3-B K1</b>	5,46E+03	4,06E-05	7,45E-09	908
<b>DIM3-B K1</b>	4,64E+03	1,64E-06	3,53E-09	848
Celda de flujo 4-3, captura de mayor densidad Captura por Fc anti-IgG humana, IFNAR soluble (25-400 nM)				

**Ejemplo 4: Alteración de restos de CDR en secuencias de anticuerpos seleccionadas**

Se produjo una serie de cadenas pesadas alternativas con secuencias de CDR3 alteradas. Se coexpresaron una serie de combinaciones, cada una de las cuales contenía múltiples sustituciones de aminoácidos en una de las 11 posiciones en la CDR3, con la cadena ligera K1, y se purificó para su ensayo un anticuerpo de cada combinación. Se llevaron a cabo experimentos de Biacore para determinar la actividad de unión a IFNAR-1 soluble inmovilizado. Las bibliotecas de variantes de CDR3 de anticuerpos anti-IFNAR-1 se determinaron por unión de la combinación de anticuerpos a IFNAR-1 soluble inmovilizado. Se generaron unidades de respuesta de 200 nM de muestras (A: UR a asociación máx; D: UR después de una disociación de 800 segundos). Como se muestra en la Tabla 7 se determinaron para cada combinación niveles variables de actividad.

10

15

**Tabla 7**

<b>Cadena pesada de anticuerpo</b>	<b>CDR de cadena pesada</b>	<b>A: UR a la asociación máx.</b>	<b>D: UR después de una disociación de 800 segundos</b>	<b>Respuesta máx. respecto a H3K1 (%)</b>
H3 (secuencia 10)	Como en la SEC ID N°:10	194	190	100
M3-1	aa1 de CDR3 aleatorizado	74	61	38
M3-2	aa2 de CDR3 aleatorizado	147	140	76
M3-3	aa3 de CDR3 aleatorizado	98	88	51
M3-4	aa4 de CDR3 aleatorizado	102	89	53
M3-5	aa5 de CDR3 aleatorizado	60	41	31
M3-6	aa6 de CDR3 aleatorizado	21	12	11
M3-7	aa7 de CDR3 aleatorizado	104	99	54
M3-8	aa8 de CDR3 aleatorizado	26	19	14
M3-9	aa9 de CDR3 aleatorizado	87	83	45
M3-10	aa10 de CDR3 aleatorizado	45	38	23
M3-11	aa11 de CDR3 aleatorizado	149	146	77

5 Se seleccionaron las combinaciones 4 y 11 para un estudio adicional y se produjeron los anticuerpos individuales en cada combinación y se expresaron por separado. Las secuencias de estos anticuerpos individuales eran como se muestra en la SEC ID N°: 12 de la Figura 1F y en la SEC ID N°: 13 de la Figura 1G. Se muestra en la Tabla 8 un análisis de unión por Biacore de los anticuerpos individuales en la combinación 4 a IFNAR-1. Los datos se presentan como asociación máxima respecto a M3K1. El análisis de Biacore de la unión de los anticuerpos individuales en la combinación 11 a IFNAR-1 se muestra en la Tabla 9. Los datos se presentan como asociación máxima respecto a M3K1

**Tabla 8**

<b>Cadena pesada</b>		<b>Resto de aminoácido X</b>	<b>Cadena ligera</b>		<b>% actividad respecto a M3K1</b>
Nombre	SEC ID N°:		Nombre	SEC ID N°:	
H3	10	-	K1	21	115
M3	11	-	K1	21	100
M3-4	12	L	K1	21	126
M3-4	12	N	K1	21	49
M3-4	12	E	K1	21	128
M3-4	12	V	K1	21	122
M3-4	12	A	K1	21	107

10



ES 2 368 737 T3

(continuación)

Cadena pesada		Resto de aminoácido X	Cadena ligera		% actividad respecto a M3K1
Nombre	SEC ID N°:		Nombre	SEC ID N°:	
M3-4	12	C	K1	21	123
M3-4	12	G	K1	21	114
M3-4	12	S	K1	21	110
M3-4	12	I	K1	21	106
M3-4	12	R	K1	21	106
M3-4	12	D	K1	21	100
M3-4	12	M	K1	21	101
M3-4	12	H	K1	21	79
M3-4	12	T	K1	21	103
M3-4	12	W	K1	21	93
M3-4	12	K	K1	21	86

**Tabla 9**

Cadena pesada		Resto de aminoácido X	Cadena ligera		% actividad respecto a M3K1
Nombre	SEC ID N°:		Nombre	SEC ID N°:	
H3	10	-	K1	21	138
M3	11	-	K1	21	100
M3-11	13	L	K1	21	75
M3-11	13	E	K1	21	105
M3-11	13	Q	K1	21	73
M3-11	13	R	K1	21	220
M3-11	13	V	K1	21	108
M3-11	13	A	K1	21	93
M3-11	13	F	K1	21	93
M3-11	13	G	K1	21	63
M3-11	13	C	K1	21	64
M3-11	13	I	K1	21	81
M3-11	13	T	K1	21	82
M3-11	13	W	K1	21	70
M3-11	13	H	K1	21	104
M3-11	13	K	K1	21	82
M3-11	13	D	K1	21	67
M3-11	13	S	K1	21	39

La unión a IFNAR-1 se mantuvo por todas las variantes producidas con actividades de unión a antígeno variables, como se muestra en las tablas 8 y 9.

#### Ejemplo 5: Análisis de unión de Scatchard de anti-IFNAR-1

##### Anticuerpos humanizados contra células

- 5 Se usaron células BALL-1, que expresan IFNAR-1 e IFNAR-2, para evaluar la unión de anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados a células mediante un análisis de Scatchard. Las células se cultivaron en RPMI que contenía FCS al 10 % y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a 4 grados C. Las células se ajustaron a  $4 \times 10^7$  células/ml en tampón de unión Tris (Tris 24 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, HSA al 0,1 %, glucosa 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4). Se revistieron placas Millipore (MAFB NOB) con leche en polvo desnatada al 1 % en agua y se almacenaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron con tampón de unión y se añadieron 25 ul de anticuerpo sin marcar (exceso de 1000 veces) en tampón de unión TBS a pocillos de control en una placa con filtro de fibra de vidrio de 96 pocillos Millipore (NBS de unión inespecífica). Se añadieron veinticinco microlitros de tampón solamente al pocillo de control de unión máxima (unión total). Se añadieron veinticinco microlitros de anticuerpo <sup>125</sup>I-anti-IFNAR-1 y 25 ul de suspensión de células BALL-1 ( $4 \times 10^7$  células/ml) en tampón de unión TBS. Las placas se incubaron durante 2 horas a 200 RPM en un agitador a 4 °C. A la finalización de la incubación las placas de Millipore se lavaron dos veces con 0,2 ml de tampón de unión TBS frío que contenía una concentración final de NaCl 0,5 M. Los filtros se eliminaron y se contaron en un contador gamma. Se realizó una evaluación de la unión en equilibrio usando los parámetros de unión a un solo sitio con el software Prism (San Diego, CA).
- 20 Usando el ensayo de unión de Scatchard anterior, la afinidad del anticuerpo humanizado H3K1 (isotipo IgG4) por células BALL-1 era de 4 nM, que es muy similar al 64G12 murino. Los valores de afinidad nanomolar bajos obtenidos con el ensayo de unión a células completas son comparables con los datos de Biacore, en los que se determina la afinidad del anticuerpo hacia el ligando recombinante purificado (Tabla 10). Por lo tanto, en un ensayo basado en proteína o basado en células, la afinidad de unión de los anticuerpos está en el intervalo nM bajo.

25

**Tabla 10**

	Isotipo	K <sub>D</sub> (nM) de unión a receptor (Biacore)	K <sub>D</sub> (nM) de afinidad de unión a células (BALL-1)
64G12	m IgG1	1,2	3,9
H3K1	h IgG4	3,4	4,0

#### Ejemplo 6: Los anticuerpos humanizados anti-IFNAR 1 inhiben la actividad biológica de IFN de Tipo I en ensayos de proliferación celular y de indicador sensible a IFN.

- 30 La línea celular Daudi, derivada de un linfoma de Burkitt linfoblástico B humano, expresa altos niveles de IFNAR, y el crecimiento de estas células se inhibe por interferones de tipo I. Para medir la capacidad de bloqueo funcional de anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados se realizaron dos ensayos diferentes. En el primer ensayo, se cultivaron células Daudi con interferón  $\alpha 2b$  en presencia o ausencia de anticuerpo y se midió la proliferación por captación de <sup>3</sup>[H]-timidina. Las células Daudi se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en RPMI que contenía FCS al 10 % y beta-mercaptoetanol 2 mM (medio). Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio con albúmina sérica humana al 1 % añadida (medio y HS). A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadieron 100  $\mu$ l de interferón  $\alpha 2b$  200 U/ml (Schering Corporation) que contenían la concentración apropiada de anticuerpo. Se añadieron 100  $\mu$ l de células Daudi en medio y HS a los pocillos, y las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Las placas se estimularon con 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>[H]-timidina y se incubaron durante 24 horas adicionales. Las placas se recogieron, se reunieron en una placa con filtro de fibra de 96 pocillos y se contaron usando un contador de escintilación TopCount (Packard). Los recuentos por minuto se representaron en función de la concentración de anticuerpo y los datos se analizaron mediante una regresión no lineal, dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) usando el software Prism (San Diego, CA).

- 45 En el segundo ensayo, las células U937 se transfectaron con una construcción en la que se unió un elemento de respuesta estimulado por interferón a un gen indicador (ISRE-RG) y se midió la capacidad de anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados para bloquear la expresión inducida por IFN del gen indicador. Las células se cultivaron en RPMI que contenía FCS al 10 % y beta-mercaptoetanol 2 mM (medio). Las células ( $1 \times 10^6$  células/ml) se resuspendieron en medio con suero humano al 2 % añadido. Se añadieron 100  $\mu$ l de células a una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos se diluyeron en serie en medio que contenía 200 U/ml de interferón  $\alpha 2b$  (Schering Corporation) y se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo. Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C. Después de esta incubación, se evaluó la expresión del gen indicador mediante citometría de flujo. La intensidad fluorescente media geométrica se representó en función de la concentración de anticuerpo y los datos se analizaron mediante una regresión no lineal, dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) usando el software Prism (San Diego, CA).

50

Usando los dos ensayos descritos anteriormente, se obtuvo una potencia de 2-10 nM en el ensayo de proliferación de Daudi y de 2-22 nM en el ensayo de indicador ISRE-RG. La potencia del 64G12 murino era comparable con los anticuerpos IgG1 humanizados. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 11**

	Isotipo	CI <sub>50</sub> (nM) de la proliferación celular (Daudi)	CI <sub>50</sub> (nM) de indicador ISRE-RG (U937)
64G12	m IgG1	2,1	5,8
H3K1	h IgG4	9,1	21,5
H3K1 (IgG1)	h IgG1	3,9	2,7
DI M3-BK1C	h IgG1	10	4,6

5 Debido a que los datos muestran claramente que los anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados tienen una actividad potente con IFN alfa 2b, los presentes inventores ensayaron la capacidad de los anticuerpos para inhibir respuestas de IFN  $\beta$ . Dos anticuerpos humanizados ensayados, H3K1 (IgG1) y H3K1 (IgG4), eran inhibidores potentes de la señalización celular inducida por IFN $\beta$  según se midió mediante el ensayo de indicador. El H3K1 (IgG1) era aproximadamente 10 veces más potente que el H3K1 (IgG4), mientras que el 64G12 murino era 3 veces menos potente que el H3K1 (IgG1). Los resultados de los ensayos de indicador para IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  se muestran en las gráficas de las Figuras 4A-4B.

10 Para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados para inhibir la actividad biológica de múltiples IFN de tipo I, se ensayaron distintos subtipos de IFN alfa en el ensayo de proliferación Daudi. Se incubaron células Daudi en presencia de 10 ug/ml del anticuerpo humanizado DI M3-B K1C o un control de isotipo, con uno de los subtipos de IFN alfa siguientes: 2a, 2b, 4b, 8, 10, 1, 21, 5, 14, 17, 7, 6 ó 16, o con IFN leucocitario o IFN universal. Se determinó la proliferación de Daudi como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la gráfica de barras de la Figura 5. Los resultados demuestran que el anticuerpo anti-IFNAR-1 inducía la reversión de las respuestas generadas por múltiples IFN de tipo I incluyendo, pero sin limitación, IFN leucocitario, IFN universal, IFN  $\alpha$ 2a,  $\alpha$ 2b,  $\alpha$ 4b,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 21,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 14,  $\alpha$ 17,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 6 y  $\alpha$ 16.

#### 20 **Ejemplo 7: Efectos de anticuerpos anti-IFNAR-1 sobre la maduración de células dendríticas**

El IFN alfa induce la maduración y la activación de células dendríticas en pacientes de LES. Se estableció un sistema *in vitro* para examinar la capacidad de anticuerpos anti-IFNAR-1 para inhibir la maduración de células dendríticas mediada por IFN alfa. En estos experimentos, células de sangre periférica se dirigieron hacia un fenotipo de células dendríticas por cultivo de las mismas en GM-CSF e IL-4, o GM-CSF e IFN alfa. Cultivos crecidos en presencia de GM-CSF solamente sirven como control, ya que estas células mantienen un fenotipo de tipo macrófago. El IFN alfa dirige la maduración de los cultivos de células dendríticas según se mide por la capacidad de las células para captar antígeno y por los cambios en la expresión de marcadores de superficie celular.

30 Para realizar el ensayo, se diluyó una capa leucoplaquetaria de 25 ml cuatro veces con PBS. La muestra se separó en 4 tubos cónicos de 50 ml y debajo se estratificaron 15 ml de medio de separación de linfocitos (ICN Biomedicals). Después de una centrifugación de 30 minutos a 500 x g, la capa leucoplaquetaria que contenía las PBMC se eliminó y se lavó con PBS. Las células se resuspendieron en medio de cultivo a  $4 \times 10^6$  células/ml. Los monocitos se aislaron por incubación de las PBMC ( $2,0 \times 10^7$  células/5 ml/matraz de 25 cm<sup>2</sup>) durante 1,5 h a 37 °C en medio de cultivo, y después eliminación por lavado dos veces de las células no adherentes. Después del último lavado, las células se cultivaron en medio que contenía un suero humano inactivado por calor al 1 % añadido (Gemini Bio Products). Se añadió GM-CSF (500 U/ml), IL-4 (1000 U/ml), IFN alfa (Intrón A; 1000 U/ml), IFN $\beta$  (1000 U/ml) y/o anticuerpo anti-IFNAR-1 o anticuerpo de control de isotipo (30 ug/ml) a los matraces de cultivo apropiados, y las células se cultivaron durante de tres a siete días. Para la maduración de DC, se añadió TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) el día 3 y el día 5, las DC se lavaron con PBS y se trataron con Versene 1:5000 durante 10 minutos a 37 °C. Cuando fue necesario las DC se desprendieron por raspado celular suave, se lavaron y se analizaron.

40 Cada cultivo de DC se resuspendió en medio de tinción (solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con bicarbonato sódico al 0,2 %, azida sódica al 0,01 %, EDTA 0,1 mM, HEPES 20 nM y FCS al 2 %) y se separó por igual en seis pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en V. Las células se centrifugaron por pulsos a 2100 rpm

en un rotor Sorvall RTH-750 y se resuspendieron 25 µl de medio de tinción. Se añadió un microgramo de anticuerpo conjugado con un fluorocromo específico a cada pocillo y se incubó en hielo durante 45 minutos. Las DC se lavaron tres veces, se resuspendieron en 200 µl de paraformaldehído al 2 % en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo con el FACScalibur de Becton Dickinson. Se trazaron barreras de selección en la gráfica de dispersión hacia delante frente a lateral para eliminar las células contaminantes del análisis.

El fenotipo de DC derivado de GM-CSF en presencia de IL-4 o IFNα difiere. Aunque las DC derivadas de IL-4 expresan CD1α y carecen de CD14 y CD123, las DC derivadas de IFNα expresan mayores niveles de CD123 y CD14 y menores niveles de CD1α. Además, las DC derivadas de IFNα expresan mayores niveles de moléculas coestimuladoras de MHC clase II y CD86 que los encontrados en DC derivadas de IL-4. El cotratamiento de los cultivos de IFN con el anticuerpo anti-IFNAR1 humanizado, H3K1, dio como resultado un patrón de expresión que se parece al de macrófagos (GM-CSF solamente). Además, la morfología de los cultivos tratados con IFN más H3K1 parecía de tipo macrófago, con un aspecto de tipo tortita típico. Por lo tanto, este experimento demostró que el anticuerpo anti-IFNAR-1 humanizado es capaz de inhibir la maduración de células dendríticas inducida por IFNα. Los resultados del análisis citométrico de flujo se resumen en la Tabla 12 (se muestra la mediana de la media geométrica de cuatro experimentos).

**Tabla 12**

Tratamiento	CD1a	CD123	CD14	CD86	CD58	Clase II
GM-CSF	42	135	427	172	208	123
GM-CSF e IL-4	395	0,5	0	45	73	287
GM-CSF e IFN	20	161	207	288	89	413
GM-CSF, IFN y H3K1 (IgG4)	50	86	130	125	197	141
GM-CSF, IFN y hlgG4 (control)	4	86	263	266	88	348

**Ejemplo 8: Farmacocinética e inmunogenicidad de anticuerpo anti-IFNAR-1 humanizado en monos Rhesus**

La capacidad del anticuerpo anti-IFNAR-1 humanizado H3K1 para unirse a células de sangre periférica de monos Rhesus se evaluó mediante análisis citométrico de flujo. El anticuerpo H3K1 tenía una reactividad similar con las células de rhesus a la observada con las células humanas, sugiriendo que esta especie es relevante para el ensayo animal preclínico. Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos en monos Rhesus usando H3K1 marcado con <sup>131</sup>I. La semivida (t<sub>1/2β</sub>) para H3K1 era de ~5,5 días (2 animales), según se esperaba para un anticuerpo de CDR injertada en un primate no humano.

Se observó un aumento en la velocidad de aclaramiento a día 10, que sugirió la posibilidad de inmunogenicidad. Para evaluar esto, los monos en el estudio se dosificaron tres veces con H3K1, después se reexpusieron a anticuerpo marcado. Se observó un aclaramiento rápido con una t<sub>1/2β</sub> estimada de 14-19 horas. Este resultado sugiere que el H3K1 generaba una respuesta de anticuerpo de aclaramiento en los monos. Los anticuerpos humanizados desinmunizados de la invención, descritos en los ejemplos previos, pueden usarse para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo anti-IFNAR-1 humanizado *in vivo*.

**Ejemplo 9: Neutralización de la actividad de IFNAR/IFNα mediante anticuerpo anti-IFNAR-1 humanizado en monos Rhesus**

Se usó un modelo farmacodinámico para estudiar la capacidad de los anticuerpos anti-IFNAR para inhibir la actividad de interferón *in vivo*. En este modelo, se dosificó IFN-α2b exógeno por vía intramuscular y se midió la activación de células de sangre periférica y la presencia de marcadores de activación séricos. Se trataron monos Rhesus con una infusión i.v. 10 mg/kg de AcM anti-IFNAR-1 murino 64G12, AcM anti-IFNAR-1 humanizado H3K1 o control de vehículo. Esto se siguió de una dosis i.m. de IFN-α2b humano (3 x 10<sup>6</sup> U/kg). La expresión de los marcadores de superficie celular CD86, MHC clase II, MHC clase I e IFNAR I se controló durante un periodo de 24 horas. Además, se controlaron los marcadores plasmáticos neopterina, β2 microglobulina y proteína C reactiva. Los descubrimientos principales fueron: a) el tratamiento con IFN-α2b aumentaba la expresión de MHC clase I en células de sangre periférica y la expresión aumentada se bloqueaba por el tratamiento con anticuerpo, b) los tres marcadores plasmáticos medidos se elevaron por tratamiento con IFN-α2b y el H3K1 inducía un bloqueo del 50 % en los niveles de neopterina y una reducción del 25 % en CRP, mientras que no se observaron cambios con la β2 microglobulina. Por lo tanto, se observó una respuesta medible *in vivo* contra IFNα2b que se bloqueaba parcialmente por el tratamiento con anticuerpo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al receptor de IFN alfa 1, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (a) SEC ID NO: 13, en la que X es R;  
 (b) SEC ID NO: 17;  
 (c) SEC ID NO: 15;  
 (d) SEC ID NO: 18; y  
 (e) SEC ID NO: 12, en la que X es L, E, V, C o R; y

10 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

2. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende además dominios constantes pesados y ligeros humanos.

15 3. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, en el que la región constante pesada humana es seleccionada del grupo que consiste en gamma 1, gamma 2, gamma 3 y gamma 4 humanas.

4. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, en el que la región constante pesada humana es gamma 1.

5. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

20 una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 13, en la que X es R; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

6. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 17; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

7. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

25 una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 15; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

8. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 18; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

30 9. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 12, en la que X es L; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

10. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

35 una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 12, en la que X es E; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

11. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 12, en la que X es V; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

12. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

40 una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 12, en la que X es C; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

13. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 12, en la que X es R; y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 21.

45

**FIG. 1A: 64G12 VH**

QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGIGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDKYYNPSLKSQLTISRDTST  
 NQVFLNITSVDTVDTATYYCGRNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:7)

**FIG. 1B: H2**

QVTLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGIGWIRQPPGKALEWLAHIWWDKYYNPSLKSRLTISRDTSK  
 NQVVLMTNMDPVDATYYCGRNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:8)

**FIG. 1C: H2-C3**

QVTLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDKYYNPSLKSRLTISRDTSK  
 NQVVLMTNMDPVDATYYCGRNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:9)

**FIG. 1D: H3**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGMGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKSRLTISRDT  
 SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:10)

**FIG. 1E: M3**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGMGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKSRLTISRDT  
 SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:11)

**FIG. 1F: M3-4**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGMGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKSRFTISRDT  
SKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARNYYXDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:12)

**FIG. 1G: M3-11**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGMGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKSRFTISRDT  
SKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDXWGQGLTVTS (SEC ID N°:13)

**FIG 1H: M3-A**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGAGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKSRFTISRDT  
KNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:14)

**FIG 1I: M3-B**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGMGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKARFTISRDT  
SKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:15)

**FIG. 1J: M3-A/B**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAFSGFTLSTSGAGIGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDKYYNPSLKARFTISRDT  
KNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGLTVTS (SEC ID N°:16)

**FIG. 1K: DI M3**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSLSCAASGFTMSTSGMGIGWJRQTPGKGLEWVAHIWWDDDKYYNPSLKSRFTISKDT  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGTLLTVS (SEC ID N°:17)

**FIG. 1L: DI M3-B**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSLSCAASGFTMSTSGMGIGWJRQTPGKGLEWVAHIWWDDDKYYNPSLKARFTISRDT  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNYYPYDAWFDYWGQGTLLTVS (SEC ID N°:18)



**FIG. 2A: 64G12 VL**

EIVLTQSPPTTMAASPGEKITITCSASSINSNHLHWYQQKPGFSPKVLIIYRTSILASGVPTFRFSGSGGTSYSLTIGTM  
EAEDVATYYCQQGSNIPETFGSGTELEIKR (SEC ID N°:19)

**FIG. 2B: K6**

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSINSNHLHWYQQKPGQSPKLLIYRTSILASGVPSRFRFSGSGGTSFTLTINSL  
EAEDVATYYCQQGSNIPETFGQGTKLEIKR (SEC ID N°:20)

**FIG. 2C: K1**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYYCQQGSNIPETFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:21)

**FIG. 2D: K1-C**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASTSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYYCQQGSNIPETFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:22)

**FIG. 2E: K1-D**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYYCQQGSNIPETFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:23)

**FIG. 2F: K1-E**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYCCQQTSNIPFIFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:24)

**FIG. 2G: K1-C/D**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASTSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYCCQQTGSNIPFIFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:25)

**FIG. 2H: K1-C/E**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASTSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYCCQQTSNIPFIFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:26)

**FIG. 2I: K1-D/E**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYCCQQTSNIPFIFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:27)

**FIG. 2J: K1-C/D/E**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASTSINSNHLHWYQQKPKAPKLLIYRTSILASGVPSRFSGSGGTSFTLTISS  
LQPEDFATYCCQQTSNIPFIFGQGTKVEIKR (SEC ID N°:28)

**FIG. 2K: DI K1**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYLQKPGKAPKALYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTISL  
QPEDTATYYCQGGSNIPFTFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:29)

**FIG. 2L: DI K1-C**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASTSINSNHLHWYLQKPGKAPKALYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTISL  
QPEDTATYYCQGGSNIPFTFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:30)

**FIG. 2M: DI K1-DS**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYLQKPGKAPKALYRTSILASG/PSRFSGSGGTSFTLTISL  
QPEDTATYYCQGGSNIPFTFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:31)

**FIG. 2N: DI K1-C-DS**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASTSINSNHLHWYLQKPGKAPKALYRTSILASG/PSRFSGSGGTSFTLTISL  
QPEDTATYYCQGGSNIPFTFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:32)

**FIG. 2O: DI K1-A19V**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYLQKPGKAPKALYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTISL  
QPEDTATYYCQGGSNIPFTFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:33)

**FIG. 2P: DI K1-L37Q**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYQKPGKAPKALIYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTSS  
LQPED7ATYYCQQGSNIPFIFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:34)

**FIG. 2Q: DI K1-A46L**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYQKPGKAPKLLIYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTSS  
QPED7ATYYCQQGSNIPFIFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:35)

**FIG. 2R: DI K1-I58V**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYQKPGKAPKALIYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTSS  
LQPED7ATYYCQQGSNIPFIFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:36)

**FIG. 2S: DI K1-T83F**

DIQMTQSPSSLSASVGDRAITITCSASSINSNHLHWYQKPGKAPKALIYRTSILASG/PSRFSGSGGTDFTLTSS  
QPED7ATYYCQQGSNIPFIFGQGTKVEIKRTVAAP (SEC ID N°:37)

**FIG. 3A: M3**

gagggtgcagctgttggagctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcattct  
ccgattcacctgagcacttctggatagggtataggctgggtccgccaggctcccgggaaggggctggag  
tgggtcgcacacatttgggtggatgatgataagtactataatccatccctgaagagtcggtcaccatctcca  
gagacactccaagaacacggtatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacactgcagtatatta  
ctgtgcgagaaattactatccttacgacgctggttgactactgggtcaaggtagcaccgtctca  
(SEC ID N°:38)

**FIG. 3B: K1**

gatatccagatgaccagtccccgagctccctgtccgcctctgtgggcatagggtcaccatcacctgcagt  
gccagctcaagtataaattccaatcacttacactggatcaacagaaaccaggaaagggcgggaaactgc  
tgattacaggacatccattctggcttctggagtccttctcgttctctggtccggatctgggacgtcttctactct  
gaccatcagctccctgcagccggaagacttcgcaacttactgtcagcagggtagtaatatccattcact  
ttcggacagggtagcaaggtggagatcaaact (SEC ID N°:39)

**FIG. 3C: DI M3-B**

gagggtgcagctgttggagctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagc  
ctccggcttaccatgagcactccggaatgggtataggctggatccgccagacccccgggaaggggctc  
gagtggtcgcacacatttgggtggatgatgataagtactataatccatccctgaaggctagattcaccatct  
ccagagacactccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacactgcagtat  
attactgtgcgagaaattactatccttacgacgctggttgactactgggtcaaggtagcaccgtct  
ca (SEC ID N°:40)

**FIG. 3D: K1-C**

gatatccagatgaccagtccccgagctccctgtccgcctctgtgggcatagggtcaccatcacctgcagt  
gccagcacaagtataaattccaatcacttacactggatcaacagaaaccaggaaagggcgggaaactg  
ctgattacaggacatccattctggcttctggagtccttctcgttctctggtccggatctgggacgtcttctact  
ctgaccatcagctccctgcagccggaagacttcgcaacttactgtcagcagggtagtaatatccattca  
cttccggacagggtagcaaggtggagatcaaact (SEC ID N°:41)

FIG. 4A

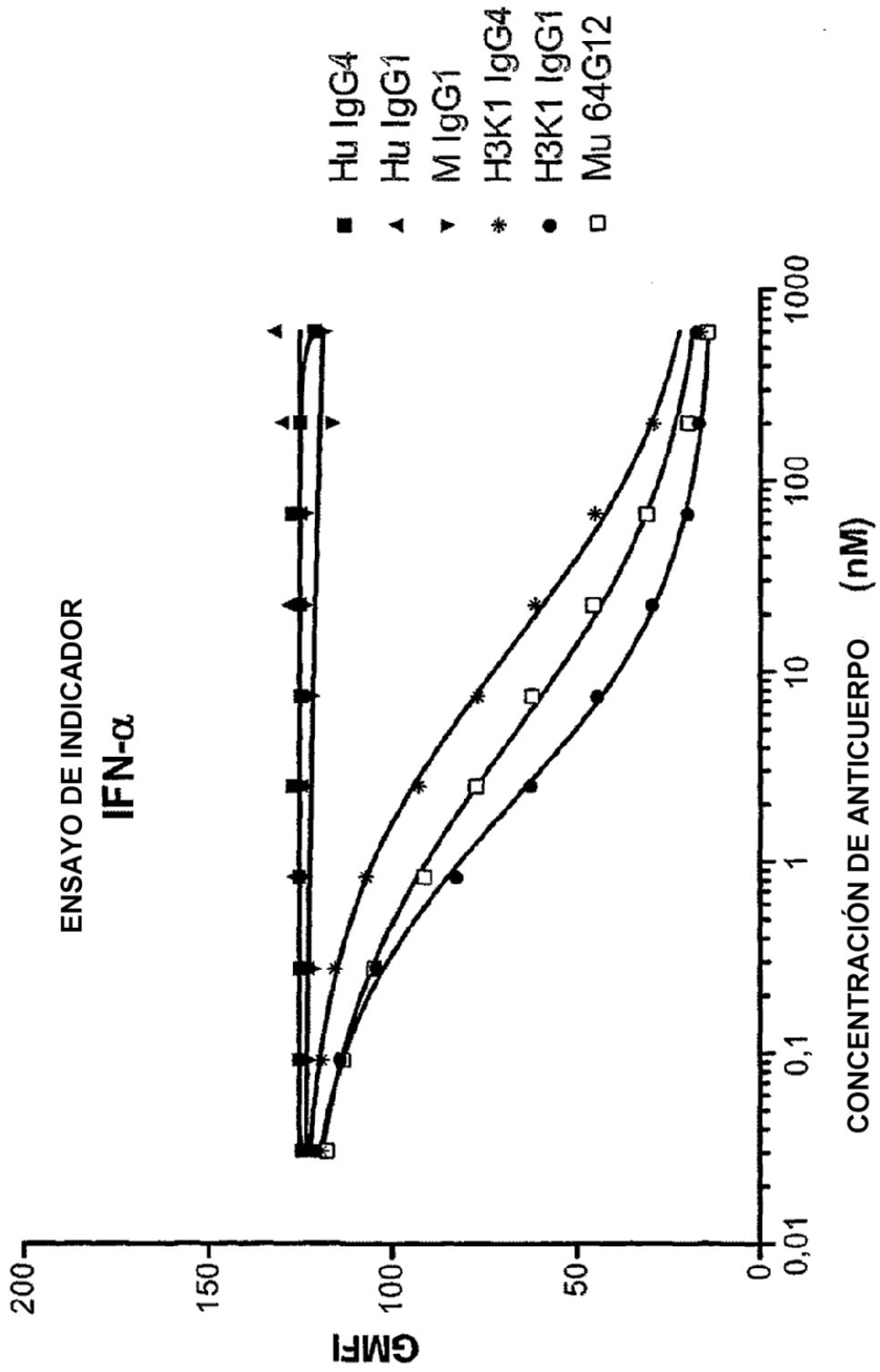


FIG. 4B

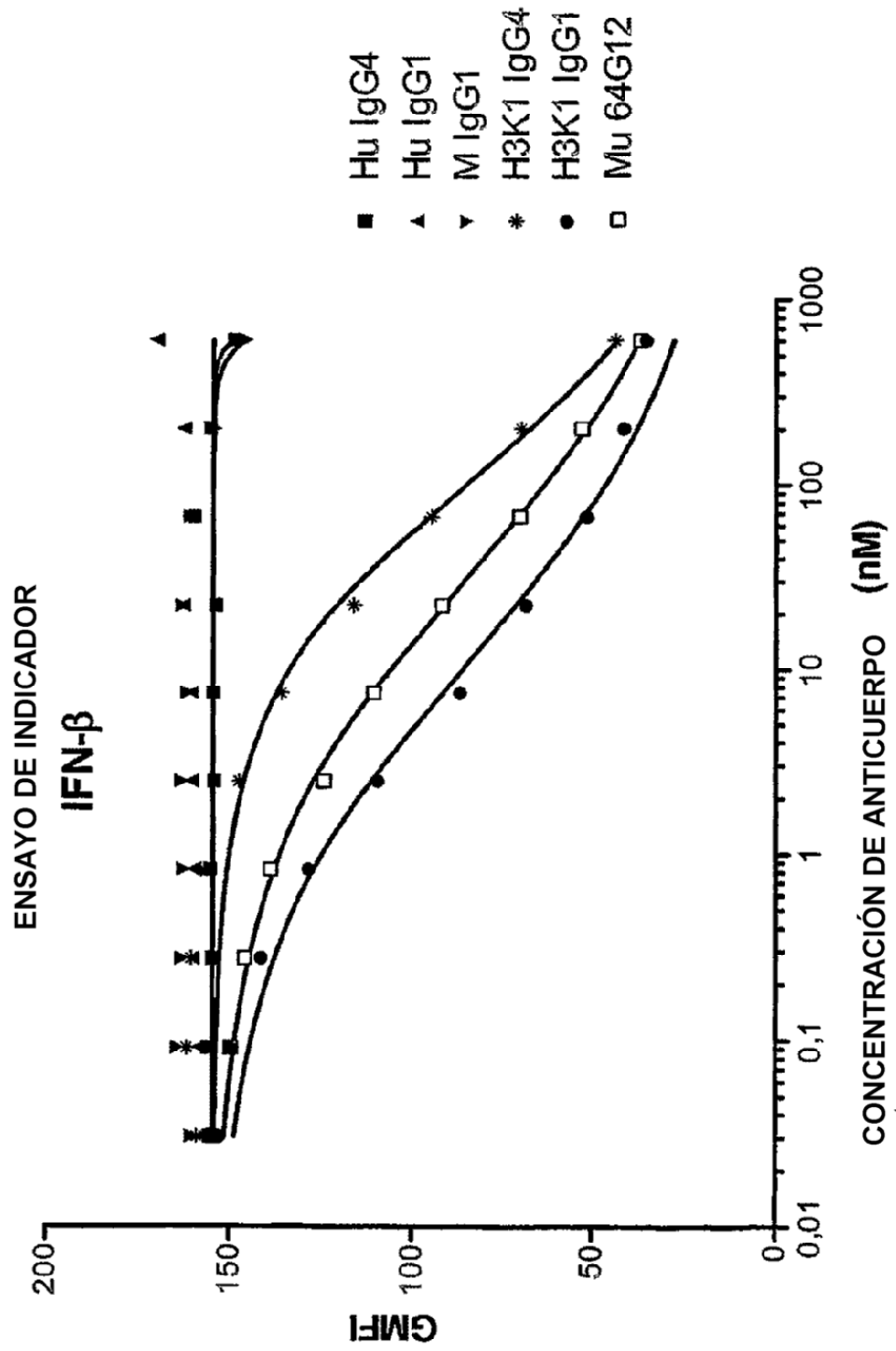


FIG. 5

