



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 370 473**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03777635 .8**
96 Fecha de presentación : **16.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1578936**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes anti-IFN- γ humanos como inhibidores selectivos de la ruta de IFN- γ .**

30 Prioridad: **16.10.2002 US 419057 P**
17.06.2003 US 479241 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2011

73 Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320, US
MEDAREX, Inc.

72 Inventor/es: **Welcher, Andrew, A.;**
Chute, Hilary, T.;
Li, Yue-Sheng y
Huang, Haichun

74 Agente: **Miltenyi, Peter**

ES 2 370 473 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes anti-IFN- γ humanos como inhibidores selectivos de la ruta de IFN- γ .

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/419.057, presentada el 16 de octubre de 2002 y la solicitud provisional estadounidense n.º 60/479.241, presentada el 17 de junio de 2003.

Campo de la invención

10 La invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que se unen a interferón gamma (IFN- γ). También se describen composiciones y métodos para tratar enfermedades mediadas por IFN- γ .

Antecedentes

15 Los interferones (IFN) se nombraron originariamente por su capacidad para interferir en la infección viral de células huésped (Isaacs y Lindenman, 1957, Proc. R. Soc. 147: 28-267). Desde su descubrimiento, se han identificado varios miembros de la familia de los interferones con diversos papeles biológicos además de la defensa antiviral, incluyendo el crecimiento celular y la inmunidad celular. Los tipos de interferón IFN- α , IFN- β , IFN- ω e IFN- τ son interferones de tipo I y se unen al receptor de IFN de tipo I, mientras que el IFN- γ es un interferón de tipo II y se une al receptor de IFN de tipo II (Pfeffer *et al.*, 1998, Cancer Res. 58: 2489-2499).

20 La señalización de IFN- γ depende de al menos cinco proteínas distintas: IFNGR1 e IFNGR2 (subunidades del receptor de IFN- γ), Jak1, Jak2 y el factor de transcripción STAT1 (Schindler y Darnell, 1995, Annu. Rev. Biochem. 64: 621-651; Bach *et al.*, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 563-591). Los receptores de IFN- γ se encuentran en la mayoría de tipos celulares, excepto los eritrocitos maduros (Farrar y Schreiber, 1993, Annu. Rev. Immunol. 11: 571-611). Las proteínas Jak1, Jak2, y STAT1 median la señalización de IFN- γ .

30 El IFN- γ regula una variedad de funciones biológicas, tales como respuestas antivirales, crecimiento celular, respuesta inmunitaria y supresión de tumores, y el IFN- γ puede mediar una variedad de enfermedades humanas. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de agentes que puedan modular la actividad biológica de IFN- γ .

35 Landolfi NF *et al.* (2001, Journal of Immunology 166(3): 1748-1754) da a conocer la humanización de un anticuerpo monoclonal de ratón de alta afinidad contra IFN- γ humano y la identificación de los residuos que son esenciales para la actividad neutralizante de los anticuerpos humanizados. El documento WO 2004/046306 (3 de junio de 2004) da a conocer fragmentos Fab completamente humanos obtenidos de una biblioteca de presentación en fago y los anticuerpos completos correspondientes que se unen a IFN- γ humano y tienen una actividad neutralizante.

Resumen de la invención

40 La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a interferón- γ (IFN- γ) y polinucleótidos que codifican para los mismos. Los anticuerpos pueden inhibir o modular al menos una de las actividades biológicas de IFN- γ y pueden ser útiles para mejorar los efectos de las enfermedades mediadas por IFN- γ . También se proporcionan mediante la invención células de hibridoma que producen y pueden secretar en medios de cultivo celular los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades mediadas por IFN- γ .

50 Específicamente, la presente invención proporciona:

1. Un anticuerpo completamente humano aislado que comprende

55 una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34;

una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35;

una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 37;

60 una CDR1 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39;

una CDR2 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 41; y

65 una CDR3 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 43,

en el que el anticuerpo se une específicamente a IFN- γ humano.

ES 2 370 473 T3

2. El anticuerpo del punto 1, que comprende
una región variable de cadena pesada idéntica en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 6
y/o la SEQ ID NO: 14 y
una región variable de cadena ligera idéntica en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12
y/o la SEQ ID NO: 16.
3. El anticuerpo del punto 2, en el que
la región variable de cadena pesada es idéntica en al menos el 95% a la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 6
y/o la SEQ ID NO: 14 y
la región variable de cadena ligera es idéntica en al menos el 95% a la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12
y/o la SEQ ID NO: 16.
4. El anticuerpo del punto 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID
NO: 12.
5. El anticuerpo del punto 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO:
8.
6. El anticuerpo del punto 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID
NO: 16.
7. El anticuerpo del punto 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y SEQ ID
NO: 20.
8. El anticuerpo del punto 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID
NO: 18.
9. El anticuerpo del punto 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID
NO: 22.
10. El anticuerpo del punto 1, en el que
la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; y
la CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.
11. El anticuerpo del punto 1, en el que
la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y
la CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.
12. El anticuerpo del punto 1, en el que
la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; y
la CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.
13. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 12, comprendiendo el anticuerpo una cadena pesada y
una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región V_H , una región C_H1 , una región C_H2 ,
y una región C_H3 y en el que la cadena ligera comprende una región V_L y una región C_L .
14. El anticuerpo del punto 13, siendo el anticuerpo un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4.
15. El anticuerpo del punto 14, siendo el anticuerpo un anticuerpo IgG1.
16. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 12, siendo el anticuerpo un anticuerpo de cadena sencilla.
17. Un polinucleótido aislado que codifica para el anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 16.
18. Un vector que comprende el polinucleótido del punto 17.
19. Una célula huésped que contiene el polinucleótido del punto 17.

ES 2 370 473 T3

20. La célula huésped del punto 19, siendo la célula huésped una célula de mamífero.
21. La célula huésped del punto 20, siendo la célula huésped una célula CHO.
- 5 22. Un método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de uno cualquiera de los puntos 19 a 21.
23. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 16.

10 En determinados aspectos, la invención describe anticuerpos, opcionalmente anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos humanos, que pueden comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

15 En determinados aspectos, se describen anticuerpos, opcionalmente anticuerpos monoclonales, que pueden ser anticuerpos humanos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada de IgG4, IgG2 o IgG1. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 expuesta en la SEQ ID
20 NO: 2 o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, los anticuerpos comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 30, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente
25 funcional o uno de unión a antígenos de los mismos. En otros aspectos, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 31, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos. En aspectos adicionales, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 32, o un fragmento de inmunoglobulina
30 inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos. En aspectos todavía adicionales, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 33, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

35 También se describen anticuerpos que se unen específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos
40 de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos y fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales de los mismos que pueden unirse específicamente a y/o inhiben o modulan la actividad biológica de IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de
45 cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de
50 aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

Se describen además anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno
55 de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una
60 secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

ES 2 370 473 T3

Se describen además anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 30, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 30, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 31, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 31, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17 o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

ES 2 370 473 T3

Se describen además anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 19, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 21, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos.

En determinados aspectos, se describen anticuerpos, que pueden inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ , que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33, en los que el anticuerpo interacciona con IFN- γ .

También se describen anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos Fv de cadena única, anticuerpos F(ab), anticuerpos F(ab)' y anticuerpos F(ab)'₂.

ES 2 370 473 T3

En aspectos particulares, se describe una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 33 o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de la misma.

5

Además, se describe una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 32, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de la misma.

10

También se describen anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a IFN- γ , en los que el anticuerpo comprende: (a) regiones de entramado de cadena pesada humanas, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana; y (b) regiones de entramado de cadena ligera humanas, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región CDR3 de cadena ligera humana. En determinados aspectos, la región CDR1 de cadena pesada humana puede ser la región CDR1 de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales (AcM) 1119, 1118, 1118* ó 1121 tal como se muestran en la figura 12 y la SEQ ID NO: 34 y la región CDR1 de cadena ligera humana puede ser la región CDR1 de cadena ligera de los AcM 1119, 1118, 1121* ó 1121 tal como se muestra en la figura 13 y la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 40. En otros aspectos, la región CDR2 de cadena pesada humana puede ser la región CDR2 de cadena pesada de los AcM 1119, 1118, 1118* ó 1121 tal como se muestra en la figura 12 y la SEQ ID NO: 35 y la región CDR2 de cadena ligera humana puede ser la región CDR2 de cadena ligera de los AcM 1119, 1118, 1121* ó 1121 tal como se muestra en la figura 13 y la SEQ ID NO: 41 o la SEQ ID NO: 42. Todavía en otros aspectos, la región CDR3 de cadena pesada humana es la región CDR3 de cadena pesada de los AcM 1119, 1118, 1118* ó 1121 tal como se muestran en la figura 12 y la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 37, y la región CDR3 de cadena ligera humana es la región CDR3 de cadena ligera de los AcM 1119, 1118, 1121* ó 1121 tal como se muestran en la figura 13 y la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

15

20

25

Además, se describen métodos para tratar una enfermedad asociada con la producción aumentada de o la sensibilidad a IFN- γ y/o una enfermedad mediada por IFN- γ que comprenden la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional o uno de unión a antígenos de los mismos a un individuo que lo necesita.

30

También se describen métodos para detectar el nivel de IFN- γ en una muestra biológica, que comprenden la etapa de poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal de la invención o fragmento de unión a antígenos del mismo.

35

También se describe un anticuerpo aislado que puede unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ y comprende una CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es: (a) una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 7 de los aminoácidos de SEQ ID NO: 36 en el mismo orden y separación tal como aparecen en la SEQ ID NO: 36; o (b) una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 37. El anticuerpo puede comprender además una CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es: (a) una secuencia de aminoácidos que consiste al menos 8 de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 en el mismo orden y separación tal como se encuentran en la SEQ ID NO: 43; o (b) una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 9 de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 en el mismo orden y separación tal como se encuentran en la SEQ ID NO: 44. El anticuerpo puede comprender además una o más CDR seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42. La CDR3 de cadena pesada puede consistir en al menos los aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y la CDR3 de cadena ligera puede consistir en al menos los aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.

40

45

50

Además, se describen anticuerpos aislados que pueden unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ que comprenden una CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es: (a) una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 8 de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 en el mismo orden y separación tal como aparecen en la SEQ ID NO: 43; o (b) una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 9 de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 en el mismo orden y separación tal como aparecen en la SEQ ID NO: 44. El anticuerpo puede comprender además una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42.

55

Un anticuerpo aislado de la invención, que puede unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ , comprende seis CDR que tienen al menos las secuencias de aminoácidos de: (a) SEQ ID NO: 34; (b) SEQ ID NO: 35; (c) SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37; (d) SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39, (e) SEQ ID NO: 41 y (f) SEQ ID NO: 43.

60

Los anticuerpos aislados de la invención, que pueden unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ , pueden comprender una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14, en los que la alineación entre la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14 abarca al menos 50 aminoácidos, y una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

65

ES 2 370 473 T3

95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 16, en los que la alineación entre la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 16 abarca al menos 50 aminoácidos.

5 En otro aspecto, se describen anticuerpos, que pueden unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ , pueden comprender una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 32, en los que la alineación entre la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 32 abarca al menos 50 aminoácidos, y/o una secuencia de aminoácidos
10 idéntica en al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 33, en los que la alineación entre la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 33 abarca al menos 50 aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos en estos anticuerpos puede comprender al menos 5 de los aminoácidos en la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 37, en el mismo orden y separación tal como aparecen en la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 37, y/o una secuencia de aminoácidos en estos anticuerpos puede comprender al menos
15 6 de los aminoácidos en la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44 en el mismo orden y separación tal como aparecen en la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

En un aspecto, se describe un anticuerpo, que puede ser un anticuerpo completamente humano aislado, en el que el anticuerpo puede inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ humano. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención, que puede ser un anticuerpo completamente humano aislado, no puede inhibir ni modular la actividad biológica de IFN- γ murino y de mono macaco. Aún en otro aspecto, un anticuerpo completamente humano de la invención puede inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ humano y de chimpancé, pero no puede inhibir ni modular la actividad biológica de IFN- γ murino y de mono macaco. Todavía en otro aspecto, la sustitución del
20 residuo 19 de IFN- γ humano por ácido aspártico y/o del residuo 20 por prolina impide o antagoniza la inhibición de la actividad biológica de IFN- γ humano por el anticuerpo. Además, el anticuerpo puede inhibir la actividad biológica de una versión mutada de IFN- γ de mono macaco sustituido en los residuos 19, 20 y 65 por histidina, serina y serina, respectivamente.

Aún en aspectos adicionales, los anticuerpos aislados que pueden unirse específicamente a y/o inhiben o modulan la actividad biológica de IFN- γ , pueden comprender una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 32, en los que la alineación entre la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 32 abarca al menos 50 aminoácidos, y/o pueden
30 comprender una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 33, en los que la alineación entre la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 33 abarca al menos 50 aminoácidos.

En una realización adicional, se describe un anticuerpo aislado que puede unirse específicamente a IFN- γ que comprende (a) una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 30, o un fragmento de una de estas secuencias y (b) una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 31, o un fragmento de una de estas secuencias. El anticuerpo puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera. El anticuerpo puede comprender (a) la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 30 y (b) la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 31.
40

Además, cualquiera de los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos.
50

La invención también proporciona polinucleótidos, incluyendo polinucleótidos aislados, que codifican para cualquiera de los anticuerpos de la invención tal como se describe en el presente documento. La invención proporciona además vectores que comprenden tales polinucleótidos y células huésped, opcionalmente células huésped de mamífero, que contienen tales polinucleótidos y/o vectores. Los anticuerpos de la invención pueden producirse cultivando tales células huésped.
55

Resultarán evidentes realizaciones preferidas específicas de la invención a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

60 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B representan una secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 1A; SEQ ID NO: 1) que codifica para una secuencia de aminoácidos (figura 1B; SEQ ID NO: 2) de una región constante de cadena pesada de los anticuerpos anti-IFN- γ 1118, 1118*, 1119, 1121 y 1121*.
65

Las figuras 2A-2B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 2A; SEQ ID NO: 3) que codifica para una secuencia de aminoácidos (figura 2B; SEQ ID NO: 4) de una región constante de cadena ligera de los anticuerpos anti-IFN- γ 1118, 1118*, 1119, 1121 y 1121*.

ES 2 370 473 T3

Las figuras 3A-3B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 3A; SEQ ID NO: 5) que codifica para una secuencia de aminoácidos (figura 3B; SEQ ID NO: 6) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IFN- γ 1119.

5 Las figuras 4A-4B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 4A; SEQ ID NO: 7) que codifica para una secuencia de aminoácidos (figura 4B; SEQ ID NO: 8) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IFN- γ 1119.

10 Las figuras 5A-5B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 5A; SEQ ID NO: 9) que codifica para la secuencia de aminoácidos (figura 5B; SEQ ID NO: 10) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IFN- γ 1118. La figura 5C representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 30) del anticuerpo anti-IFN- γ 1118*. La figura 5D representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 56) del anticuerpo anti-IFN- γ 1118*.

15 Las figuras 6A-6B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 6A; SEQ ID NO: 11) que codifica para la secuencia de aminoácidos (figura 6B; SEQ ID NO: 12) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IFN- γ 1118 ó 1118*.

20 La figuras 7A-7B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 7A; SEQ ID NO: 13) que codifica para la secuencia de aminoácidos (figura 7B; SEQ ID NO: 14) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IFN- γ 1121 ó 1121*.

25 Las figuras 8A-B representan la secuencia de nucleótidos de una parte de un ADNc (figura 8A; SEQ ID NO: 15) que codifica para la secuencia de aminoácidos (figura 8B; SEQ ID NO: 16) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IFN- γ 1121. La figura 8C representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 31) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IFN- γ 1121*. La figura 8D representa la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 57) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IFN- γ 1121*.

30 La figura 9 contiene un gráfico que muestra la neutralización o inhibición de la actividad biológica de IFN- γ en el bioensayo de A549 con los anticuerpos monoclonales 1119, 1118 y 1121.

La figura 10 contiene un gráfico que muestra la neutralización o inhibición de la actividad biológica de IFN- γ en el bioensayo de THP-1/HLA DR por los anticuerpos monoclonales 1119, 1118 y 1121.

35 La figura 11 contiene un gráfico que muestra la neutralización o inhibición de la actividad biológica de IFN- γ en un ensayo de sangre completa (dos donantes) por el anticuerpo monoclonal 1119.

40 La figura 12 muestra una alineación de una parte amino-terminal (que incluye la región variable) de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ designados como 1118, 1118*, 1121 y 1119. Las secuencias incluyen la secuencia señal codificada en los ADNc aislados en el ejemplo 3. La secuencia señal se extiende desde la posición 1 hasta la 19. Las CDR están subrayadas. Tal como se representa en la figura, CDR1 abarca desde el aminoácido 50-54, CDR2 abarca desde 69-85 y CDR3 abarca desde 118-125. El sistema de numeración de Kabat *et al.* (1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N. I. H., Bethesda, MD) comienza en el primer aminoácido del anticuerpo maduro y excluye la secuencia señal. Por tanto, la posición 20 en esta figura correspondría a la posición 1 de Kabat *et al.* (citado anteriormente).

50 La figura 13 muestra un alineamiento de una parte amino-terminal (que incluye la región variable) de las cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ designados como 1118, 1121, 1121* y 1119. Las secuencias incluyen la secuencia señal codificada en los ADNc aislados en el ejemplo 3. La secuencia señal se extiende desde la posición 1 hasta la 20. Las CDR están subrayadas. Tal como se representa en la figura, CDR1 abarca desde el aminoácido 44-55, CDR2 abarca desde 71-77 y CDR3 abarca desde 110-118. Dado que el sistema de numeración de Kabat *et al.* (citado anteriormente) excluye la secuencia señal, la posición 21 en esta figura corresponde a la posición 1 de Kabat *et al.*

55 La figura 14 muestra la producción de IP-10 en respuesta a IFN- γ por sangre completa extraída de un chimpancé 2 ó 1 semana(s) antes de (líneas marcadas como "-2" y "-1" en la figura 14) o 2, 8, 15, 29 ó 36 días después de (líneas marcadas como "2", "8", "15", "29" ó "36" en la figura 14) el inicio de un ciclo de 3 inyecciones de anticuerpo anti-IFN- γ , que se produjo una vez a la semana.

60 La figura 15 es similar a la figura 14 excepto en que se usó la sangre de un chimpancé diferente.

Descripción detallada

65 Los encabezados de sección usados en el presente documento son para fines de organización únicamente y no han de interpretarse como limitativos del contenido descrito.

Definiciones

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o tal como se describen en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se tratan en toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas y los procedimientos de laboratorio, de química analítica, química orgánica sintética, química farmacéutica y médicos descritos en el presente documento son aquellos que se conocen y se usan comúnmente en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, la preparación, formulación y administración farmacéutica, y el tratamiento de pacientes.

Tal como se utiliza según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique de otro modo, se entenderán que tienen los siguientes significados:

La expresión “polinucleótido aislado” tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de origen genómico, de ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el polinucleótido aislado (1) no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido en el que se encuentra el polinucleótido aislado en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

La expresión “proteína aislada” a la que se hace referencia en el presente documento significa que una proteína objeto (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que se encontraría normalmente en la naturaleza, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa en una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, u otros materiales con los que está asociada en la naturaleza, (5) no está asociada (mediante interacción covalente o no covalente) con partes de una proteína con la que la “proteína aislada” está asociada en la naturaleza, (6) está asociada operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Una proteína aislada de este tipo puede estar codificada por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían en su uso (terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, de investigación u de otro tipo).

Los términos “polipéptido” o “proteína” significan una o más cadenas de aminoácidos, en los que cada cadena comprende aminoácidos unidos de manera covalente mediante enlaces peptídicos, y en los que dicho polipéptido o proteína pueden comprender una pluralidad de cadenas unidas entre sí de manera covalente y/o no covalente mediante enlaces peptídicos, que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células específicamente no recombinantes y que se producen de manera natural, o células recombinantes o modificadas por ingeniería genética, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen delecciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos “polipéptido” y “proteína” abarcan específicamente anticuerpos anti-IFN- γ , o secuencias que tienen delecciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-IFN- γ . Por tanto, un “polipéptido” o una “proteína” puede que comprenda una (denominado “un monómero”) o una pluralidad (denominado “un multímero”) de cadenas de aminoácidos.

La expresión “fragmento de polipéptido” se refiere a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una delección amino-terminal, una delección carboxilo-terminal y/o una delección o sustitución interna de un polipéptido que se produce de manera natural o producido de manera recombinante. En determinadas realizaciones, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en determinadas realizaciones, los fragmentos son de al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos de polipéptido particularmente útiles incluyen dominios funcionales, incluyendo dominios de unión. En el caso de un anticuerpo anti-IFN- γ , los fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a: una región CDR, especialmente una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; un dominio variable de una cadena pesada o ligera; una parte de una cadena de anticuerpo o sólo su región variable que incluye dos CDR; y similares.

La expresión “fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional” tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos las CDR de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención puede unirse a un antígeno. En realizaciones preferidas, el antígeno es un ligando que se une específicamente a un receptor. En estas realizaciones, la unión de un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención impide o inhibe la unión del ligando a su receptor, lo que interrumpe la respuesta biológica que resulta de la unión del ligando al receptor. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente a IFN- γ . Lo más preferiblemente, el fragmento se une específicamente a y/o inhibe o modula la actividad biológica de IFN- γ humano.

ES 2 370 473 T3

La expresión “que se produce de manera natural” tal como se usa en el presente documento y aplicado a un objeto se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre es la que se produce de manera natural.

5

La expresión “unido operativamente” significa que los componentes a los que se aplica la expresión están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control de la transcripción “unida operativamente” a una secuencia que codifica para proteína está unida a la misma de manera que se logra la expresión de la secuencia que codifica para proteína en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

10

La expresión “secuencia de control” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótidos que pueden afectar a la expresión, el procesamiento y la ubicación intracelular de secuencias codificantes a las que están ligados. La naturaleza de tales secuencias de control puede depender del organismo huésped. En realizaciones particulares, las secuencias de control de la transcripción para procariotas pueden incluir un promotor, sitio de unión ribosómico y la secuencia de terminación de la transcripción. En otras realizaciones particulares, las secuencias de control de la transcripción para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias de poliadenilación. En determinadas realizaciones, las “secuencias de control” pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de pareja de fusión.

15

20

El término “polinucleótido” tal como se hace referencia en el presente documento significa polímeros de ácido nucleico monocatenario o bicatenario de al menos 10 bases de longitud. En determinadas realizaciones, los nucleótidos que comprende el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de base tales como bromouridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de uniones internucleótido tales como fosfortioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término “polinucleótido” incluye específicamente formas mono y bicatenarias de ADN.

25

30

El término “oligonucleótido” al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural, y nucleótidos modificados unidos entre sí mediante uniones de oligonucleótido que se producen de manera natural y/o que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden elementos que son generalmente monocatenarios y tienen una longitud de 200 bases o inferior. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos son de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido con referencia a una secuencia que codifica para proteína.

35

40

A menos que se especifique de otro modo, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5'; el sentido hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina el sentido 5'. El sentido de adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se denomina el sentido de la transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan “secuencias en el sentido de 5'”; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan “secuencias en el sentido de 3'”.

45

La expresión “nucleótidos que se producen de manera natural” incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión “nucleótidos modificados” incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos, y similares. La expresión “uniones de oligonucleótido” incluye uniones de oligonucleótido tales como fosfortioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Véanse, por ejemplo, LaPlanche *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Stec *et al.*, 1984, J. Am. Chem. Soc., 106:6077; Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Zon *et al.*, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford England; Stec *et al.*, patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90:543. Un oligonucleótido puede incluir un marcador detectable que permite la detección del oligonucleótido o la hibridación del mismo.

50

55

El término “vector” se usa para hacer referencia a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) usada para transferir la información codificante a una célula huésped.

60

La expresión “vector de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácidos nucleicos que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácidos nucleicos heterólogas insertadas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como transcripción, traducción y corte y empalme de ARN, si están presentes intrones.

65

ES 2 370 473 T3

La expresión “célula huésped” se usa para hacer referencia a una célula en la que se ha introducido, o puede introducirse una secuencia de ácido nucleico y expresa o puede expresar adicionalmente un gen de interés seleccionado. La expresión incluye la progenie de la célula parental, ya sea idéntica o no la progenie en morfología o en composición genética al progenitor original, siempre que esté presente el gen seleccionado.

El término “transducción” se usa para hacer referencia a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente mediante un fago. “Transducción” también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas mediante retrovirus.

El término “transfección” se usa para hacer referencia a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando se ha introducido el ADN exógeno dentro de la membrana celular. En la técnica se conocen bien varias técnicas de transfección y se dan a conocer en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al.*, 1986, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier; y Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Pueden usarse tales técnicas para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

El término “transformación” tal como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un ADN nuevo. Por ejemplo, se transforma una célula cuando se modifica genéticamente desde su estado nativo. Tras la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse de manera transitoria como un elemento episomal sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

La expresión “que se produce de manera natural” o “nativo” cuando se usan en conexión con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y que el hombre no ha manipulado. De manera similar, “que no se produce de manera natural” o “no nativo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o se ha sintetizado por el hombre.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o una parte de una molécula que puede unirse mediante un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y que puede usarse adicionalmente en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante polipeptídico, que puede unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Un epítipo es una región de un antígeno que se une mediante un anticuerpo. En determinadas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-7}$ o 10^{-8} M. En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio puede ser $\leq 10^{-9}$ M o 10^{-10} M.

Tal como se usa en el presente documento, cuando una primera secuencia consiste en, por ejemplo, 10 aminoácidos de la secuencia RASQSVSSSY (SEQ ID NO: 56), otra secuencia tiene 7 aminoácidos en el “mismo orden y separación” tal como aparecen en la primera secuencia si 7 aminoácidos son idénticos a aquellos en la secuencia y aparecen en las mismas posiciones relativas tal como aparecen en la secuencia. Por ejemplo, una secuencia RAAAVSSSY (SEQ ID NO: 57) tiene 7 aminoácidos en el mismo orden y separación tal como aparecen en RASQSVSSSY (SEQ ID NO: 56). Por el contrario, esto no es cierto para una secuencia RASSVSSSY (SEQ ID NO: 58), dado que contiene una delección interna en relación con RASQSVSSSY (SEQ ID NO: 56), con 3 y 6 aminoácidos a cada lado de la delección. Por tanto, tiene como máximo 6 aminoácidos en el mismo orden y separación que la primera secuencia. La secuencia más corta posible que podría tener 7 aminoácidos en el mismo orden y separación que en RASQSVSSSY (SEQ ID NO: 56) sería de 7 aminoácidos de longitud, por ejemplo SQSVSSS (SEQ ID NO: 59).

El término “identidad” tal como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptido o dos o más moléculas de ácido nucleico, según se determina comparando las secuencias de las mismas. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencias entre las moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, tal como pueda ser el caso, según se determina mediante la coincidencia entre cadenas de dos o más secuencias de nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. La “identidad” mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones con huecos (si las hubiera) tratadas mediante un programa informático o un modelo matemático particular (es decir, “algoritmos”).

El término “similitud” se usa en la técnica con respecto a un concepto relacionado, pero a diferencia de “identidad”, “similitud” se refiere a una medición de la relación, que incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias por sustitución conservativa. Si dos secuencias de polipéptido tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos, y el resto son todas sustituciones no conservativas, entonces la identidad y la similitud en porcentaje serían ambas del 50%. Si

ES 2 370 473 T3

en el mismo ejemplo, hay cinco posiciones más en las que hay sustituciones conservativas, entonces la identidad en porcentaje sigue siendo del 50%, pero la similitud en porcentaje sería del 75% (15/20). Por tanto, en casos en los que existen sustituciones conservativas, la similitud en porcentaje entre dos polipéptidos será superior a la identidad en porcentaje entre esos dos polipéptidos.

5

La identidad y similitud de ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, (Lesk, A. M., ed.), 1988, Oxford University Press, Nueva York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (Smith, D. W., ed.), 1993, Academic Press, Nueva York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Parte 1, (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.), 1994, Human Press, Nueva Jersey; von Heinje, G., SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, Nueva York; Carillo *et al.*, 1988, SIAMJ. Applied Math., 48:1073; y Durbin *et al.*, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press.

10

15

Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Se describen métodos para determinar la identidad en programas informáticos disponibles para el público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410). El programa BLASTX está disponible al público a partir del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, 1990, citado anteriormente). Para determinar la identidad, también puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido.

20

25

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos o polinucleótidos pueden dar como resultado la coincidencia de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta región alineada pequeña puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no exista ninguna relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana. En algunas realizaciones, la alineación puede comprender al menos 60, 70, 80, 90, 100, 110 ó 120 aminoácidos del polipéptido diana. Si se alinean los polinucleótidos usando GAP, la alineación puede abarcar al menos aproximadamente 100, 150 ó 200 nucleótidos, que pueden ser contiguos.

30

35

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse la identidad de secuencia en porcentaje para determinar la coincidencia máxima de sus aminoácidos respectivos (el "tramo coincidente", según se determina mediante el algoritmo). En determinadas realizaciones, junto con el algoritmo se usan una penalización por apertura de huecos (que se calcula como tres veces la diagonal promedio; en la que la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que esté utilizándose; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácido por la matriz de comparación particular) y una penalización de extensión de hueco (que es habitualmente una décima parte de la penalización por apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM250 o BLOSUM 62. En determinadas realizaciones, el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véanse Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).

40

45

En determinadas realizaciones, los parámetros para una comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

50

Algoritmo: Needleman *et al.*, 1970, J. Mol. Biol., 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, 1992, citado anteriormente;

Penalización de hueco: 12;

55

Penalización de longitud de hueco: 4;

Umbral de similitud: 0.

60

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. Para las secuencias de nucleótidos, los parámetros pueden incluir una penalización de hueco de 50 y una penalización de longitud de hueco de 3, es decir una penalización de 3 por cada símbolo en cada hueco. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización para los huecos de extremo) usando el algoritmo GAP.

65

Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase IMMUNOLOGY-A SYNTHESIS, 2ª edición, (E. S. Golub y D. R. Gren, Eds.), Sinauer Associa-

ES 2 370 473 T3

tes: Sunderland, MA, 1991. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, el sentido hacia la izquierda es el sentido amino-terminal y el sentido hacia la derecha es el sentido carboxilo-terminal, según el convenio y el uso convencionales.

Los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades comunes de la cadena lateral:

- 1) hidrófobos: norleucina (Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden englobar residuos de aminoácido que no se producen de manera natural, que se incorporan normalmente mediante síntesis química de péptidos en vez de mediante síntesis en sistemas biológicos. Éstos incluyen formas peptidomiméticas y otras formas inversas o revertidas de restos de aminoácidos.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al realizar cambios de este tipo, según determinadas realizaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de carga e hidrofobicidad. Éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de aminoácidos al conferir función biológica interactiva en una proteína (véase, por ejemplo, Kyte *et al.*, 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Se sabe que pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen una puntuación o un índice hidropático similares y todavía conservan una actividad biológica similar. Al realizar cambios basándose en el índice hidropático, se incluye en determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En determinadas realizaciones, se incluyen aquéllos que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, se incluyen aquéllos dentro de $\pm 0,5$.

En la técnica también se entiende que puede realizarse de manera eficaz la sustitución de aminoácidos similares basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o el péptido biológicamente funcionales creados de ese modo están destinados al uso en realizaciones inmunológicas, tal como se dan a conocer en el presente documento. En determinadas realizaciones, la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, determinada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a estos residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , en determinadas realizaciones, se incluyen aquéllos que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, se incluyen aquéllos dentro de $\pm 0,5$. También pueden identificarse epítopos de secuencias de aminoácidos primarias basándose en su hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan "regiones de núcleo epitópicas".

En la tabla 1 se exponen sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo.

ES 2 370 473 T3

TABLA 1

Sustituciones de aminoácidos

5

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Un experto podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido tal como se exponen en el presente documento usando técnicas bien conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir su actividad seleccionando como diana regiones que no se consideran importantes para la actividad. En otras realizaciones, el experto puede identificar residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar de manera adversa a la estructura del polipéptido.

60

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

65

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la técnica puede predecir la alineación de los residuos de aminoácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales a los residuos de aminoácido que se predice que van a estar en la superficie de la proteína, dado que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una sustitución de un solo aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Entonces, las variantes pueden examinarse usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio a un residuo de aminoácido particular dio como resultado una actividad inadecuada, reducida de manera indeseable o destruida, pueden evitarse las variantes con un cambio de este tipo. En otras palabras, basándose en la información recopilada de tales experimentos rutinarios, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales o bien solas o bien en combinación con otras mutaciones.

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

Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen “reconocimiento de plegamiento” (“threading”) (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), “análisis de perfil” (Bowie *et al.*, 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov *et al.*, 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:4355-4358), y “unión evolutiva” (véase Holm, 1999, citado anteriormente; y Brenner, 1997, citado anteriormente).

Según determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión, y/o (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en tales polipéptidos. Según determinadas realizaciones, pueden realizarse sustituciones de un solo aminoácido o de múltiples aminoácidos (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). En realizaciones preferidas, una sustitución de aminoácido conservativa normalmente no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, Nueva York; *INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE* (C. Branden y J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, Nueva York, N. Y.; y Thornton *et al.*, 1991, *Nature* 354:105.

En la industria farmacéutica se usan comúnmente análogos peptídicos como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan “miméticos peptídicos” o “peptidomiméticos”. Véanse Fauchere, 1986, *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber & Freidinger, 1985, *TINS* pág. 392; y Evans *et al.*, 1987, *J. Med. Chem.* 30:1229. Tales compuestos a menudo se desarrollan con la ayuda de la modelización molecular computerizada. Pueden usarse peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como anticuerpo humano, pero tienen una o más uniones peptídicas sustituidas opcionalmente por una unión seleccionada de: $-\text{CH}_2\text{-NH}-$, $-\text{CH}_2\text{-S}-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante métodos bien conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, puede usarse la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo & Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “anticuerpo” o “péptido(s) de anticuerpo” se refieren a una proteína monomérica o multimérica que comprende una o más cadenas de polipéptido. Un anticuerpo puede unirse específicamente a un antígeno y puede inhibir o modular la actividad biológica del antígeno. Los “anticuerpos” inclu-

5 yen anticuerpos que se producen de manera natural, que se describen a continuación. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos mediante técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, se producen anticuerpos mediante escisión enzimática o química de anticuerpos que se producen de manera natural. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, y fragmentos Fv de cadena sencilla, así como anticuerpos de cadena sencilla, quiméricos, humanizados, completamente humanos, policlonales y monoclonales. Como mínimo, un anticuerpo, tal como se pretende en el presente documento, comprende un polipéptido que puede unirse específicamente a un antígeno que comprende la totalidad o parte de una región variable de cadena pesada o ligera.

10 Una región variable comprende al menos tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada o ligera (CDR, conocidas también como regiones hipervariables, designadas como CDR1, CDR2 y CDR3 por Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N. I. H., Bethesda, MD; véanse también Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-17; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:877-83) insertadas dentro de una región de entramado (designadas como regiones de entramado 1-4, FR1, FR2, FR3 y FR4, por Kabat *et al.*, citado anteriormente; véase también Chothia y Lesk, citado anteriormente). Las CDR y los segmentos de entramado se intercalan tal como sigue, comenzando en el extremo amino-terminal de la región variable: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

15 Las secuencias primarias de las regiones de entramado de regiones variables de anticuerpo tienen un puñado de residuos que se conservan de manera universal en todos los filos. Sin embargo, muchos residuos están altamente conservados en todos los filos y/o dentro de las especies y/o los filos, y muchas posiciones en los anticuerpos están ocupadas habitualmente por uno de un grupo conocido de aminoácidos. Véase Kabat *et al.*, citado anteriormente. Alternativamente, puede reconocerse una secuencia como un anticuerpo mediante su estructura terciaria predicha. La estructura terciaria de las regiones variables, que comprende 9 cadenas β que forman una estructura conocida como un barril β de llave griega, está extremadamente bien conservada, y las posiciones de las CDR dentro de esta estructura también están altamente conservadas. Véanse por ejemplo, Bork *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 242:309-20; Hunkapiller y Hood, 1989, *Adv. Immunol.* 44:1-63; Williams y Barclay, 1988, *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405; Chothia y Lesk, citado anteriormente; Kabat *et al.*, citado anteriormente.

20 La estructura terciaria puede predecirse mediante diversos programas informáticos, tales como, por ejemplo, GENEFOLD[®] (Tripos, Inc., San Luis, MO; Godzik y Skolnik, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12098-12102; Godzik *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 227:227-38; Godzik *et al.*, 1993, *Protein Engng.* 6:801-10), un programa de reconocimiento de plegamiento de proteínas que superpone una secuencia de proteína de consulta sobre representantes estructurales del Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) (Berman *et al.*, 2000, *Nucleic Acids Res* 28:235-242; Jaroszewski *et al.*, 1998, *Prot Sci* 7:1431-1440). Para usar GENEFOLD[®] para clasificar una nueva secuencia de aminoácidos, se introduce la secuencia en el programa, que asigna una puntuación de probabilidad que refleja cómo de bien se pliega sobre estructuras proteicas conocidas previamente (estructuras “molde”) que están presentes en la base de datos GENEFOLD[®]. Para la puntuación, GENEFOLD[®] se basa en la similitud de la secuencia de aminoácidos primaria, patrones ocultos de residuos, interacciones locales y comparaciones de estructuras secundarias. El programa GENEFOLD[®] pliega (o reconoce el plegamiento de) la secuencia de aminoácidos sobre todas las estructuras molde en una base de datos preexistente de plegamientos de proteínas, que incluye las estructuras resueltas para varios anticuerpos. La salida del GENEFOLD[®] son tres listas de proteínas procedentes de la base de datos, cuyas estructuras terciarias son las que es más probable que asuma la secuencia de aminoácidos de entrada. Las tres listas contienen tres puntuaciones diferentes calculadas basándose en (i) sólo la secuencia, (ii) la secuencia más preferencias de conformación local más términos de ocultación, y (iii) la secuencia más preferencias de conformación local más términos de ocultación más la estructura secundaria. En cada caso, el programa determina la alineación óptima, calcula la probabilidad (valor P) de que este grado de alineación se produzca al azar, y notifica la inversa del valor P como la puntuación, siendo 999,9 (9,999 x 10²) la mayor puntuación posible. Por tanto, la mayor puntuación indica la menor probabilidad de que la alineación se produzca al azar. Por tanto, estas puntuaciones reflejan el grado en el que la nueva proteína coincide con diversas estructuras de referencia y son útiles para asignar que una nueva proteína pertenece a una familia conocida de proteínas. Por ejemplo, se esperaría que una secuencia que tiene la estructura de una región variable de anticuerpo se alinee con al menos una región variable de anticuerpo conocida con un valor P razonablemente alto, tal como de al menos aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o superior.

25 La expresión “cadena pesada” incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad de unión para IFN- γ . La expresión “cadena ligera” incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad de unión para IFN- γ . Una cadena pesada o ligera de este tipo puede, pero no es necesario, unirse a IFN- γ en ausencia de una cadena ligera, si es una cadena pesada, o una cadena pesada, si es una cadena ligera. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H, y tres dominios de región constante, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. El dominio V_H está en el extremo amino-terminal del polipéptido, y el dominio C_{H3} está en el extremo carboxilo-terminal. La expresión “cadena pesada”, tal como se usa en el presente documento, engloba una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_L, y un dominio de región constante, C_L. Al igual que la cadena pesada, el dominio de región variable de la cadena ligera está en el extremo amino-terminal del polipéptido. La expresión “cadena ligera”, tal como se usa en el presente documento, engloba una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma. Un fragmento F(ab) se compone de una cadena ligera y el C_{H1} y las regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula de F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento F(ab') contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C_{H1} y

C_H2 , de manera que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula de $F(ab')_2$. La región Fv comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes. Los anticuerpos de cadena sencilla son moléculas de Fv en las que se han conectado las regiones variables de cadena pesada y ligera mediante un conector flexible para formar una cadena de polipéptido sencilla, que forma una región de unión a antígenos. Los anticuerpos de cadena sencilla se tratan en detalle en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 88/01649 y las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.778 y 5.260.203.

Se describen anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos. Tal como se pretende en el presente documento, los anticuerpos completamente humanos comprenden secuencias de aminoácidos sólo codificadas por polinucleótidos que son, en última instancia, de origen humano o secuencias de aminoácidos que son idénticas a tales secuencias. Tal como se pretende en el presente documento, los anticuerpos codificados por ADN que codifica para inmunoglobulina humana insertado en un genoma de ratón producido en un ratón transgénico son anticuerpos completamente humanos dado que están codificados por ADN que es, en última instancia, de origen humano. En esta situación, puede reordenarse ADN que codifica para inmunoglobulina humana (para que codifique para un anticuerpo) en el ratón, y también pueden producirse mutaciones somáticas. Los anticuerpos codificados por ADN originariamente humano que se ha sometido a tales cambios en un ratón son anticuerpos completamente humanos tal como se pretende en el presente documento. El uso de ratones transgénicos de este tipo hace posible seleccionar anticuerpos completamente humanos contra un antígeno humano. En la naturaleza, no es posible en la mayoría de los casos dado que una respuesta inmunitaria humana contra un autoantígeno no se produce normalmente. Un experto en la técnica apreciará que los anticuerpos completamente humanos son ventajosos para su uso como agentes terapéuticos, particularmente para tratar enfermedades crónicas, dado que es poco probable que desencadenen una respuesta inmunitaria contra ellos mismos. Por el contrario, se sabe que muchos anticuerpos no humanos desencadenan una respuesta inmunitaria contra ellos mismos cuando se usan en seres humanos, una situación que vuelve poco recomendable el uso crónico de tales anticuerpos en seres humanos. Por tanto, los anticuerpos completamente humanos solucionan un problema vigente desde hace tiempo confrontado al usar anticuerpos para tratar afecciones crónicas, incluyendo enfermedades humanas. Véase por ejemplo Billiau, 1988, *Immunol. Today* 9:37-40; Horneff *et al.*, 1991, *Clin. Immunol. & Immunopathol.* 59:89-103; Tjandra *et al.*, 1990, *Immunol & Cell Biol.* 68:367-76. Por tanto, los anticuerpos anti-IFN- γ completamente humanos son particularmente muy adecuados para el tratamiento de enfermedades mediadas por IFN- γ crónicas humanas, tales como enfermedades autoinmunitarias.

En un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a un anticuerpo de este tipo excepto en sus CDR. Las CDR, que están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en la región de entramado de lámina β de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25, Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36. Este trabajo remarca la importancia fundamental de las CDR en la formación de un sitio de unión a antígeno. Un anticuerpo quimérico comprende una región constante humana (que está codificada por un polinucleótido de origen humano o es idéntica a una región constante humana de este tipo) y una región variable no humana. La creación de tales anticuerpos se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.681.722.

Un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo “multiespecífico” o “multifuncional”, en determinadas realizaciones, se entiende que comprende sitios de unión que tienen especificidad antigénica idéntica.

En la evaluación de la especificidad y unión a anticuerpos según la invención, un anticuerpo se une específicamente y/o inhibe sustancialmente la adhesión de un IFN- γ a su receptor cuando un exceso del anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido a IFN- γ , o viceversa, en al menos aproximadamente el 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más (tal como se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*). Puede esperarse que un anticuerpo de unión específica tenga una constante de disociación en equilibrio para la unión a IFN- γ inferior a o igual a 10^{-8} molar, opcionalmente inferior a o igual a 10^{-9} o 10^{-10} molar.

Para uso terapéutico, una característica importante de un anticuerpo anti-IFN- γ es si puede inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ . El IFN- γ tiene muchos efectos biológicos distintos, que pueden medirse en muchos ensayos diferentes en diferentes tipos de células. La capacidad de un anticuerpo anti-IFN- γ para inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ puede medirse usando el ensayo de A549 descrito en el ejemplo 6 a continuación o usando un ensayo similar en el que se mide la capacidad de un anticuerpo para revertir la inhibición de la proliferación celular observada en presencia de IFN- γ . Para que el ensayo produzca resultados significativos, la proliferación de las células usadas en el ensayo debe inhibirse mediante el IFN- γ usado en el ensayo. El IFN- γ humano puede inhibir la proliferación de algunos tipos de células, incluyendo las células A549 (ejemplos 6 y 7). El IFN- γ murino puede inhibir la proliferación de las células RAW 264.7 (ejemplo 7), pero no las células A549. Especialmente cuando se somete a prueba la capacidad de un anticuerpo para inhibir o modular la actividad biológica de un IFN- γ no humano, pueden usarse tipos de células distintos de las células A549 dado que el IFN- γ no humano puede ser capaz de inhibir o no la proliferación de las células A549. No todos los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno pueden bloquear la unión del antígeno a su receptor normal y por tanto inhibir o modular los efectos biológicos del antígeno tras la unión a su receptor. Tal como se conoce en la técnica, un efecto de este tipo puede depender de a qué parte del antígeno se une el anticuerpo o de las concentraciones tanto absolutas como las relativas del antígeno y del anticuerpo, en este caso, IFN- γ y el anticuerpo anti-IFN- γ . Para considerarse que puede inhibir o modular la actividad

biológica de IFN- γ tal como se pretende en el presente documento, un anticuerpo debe poder revertir la inhibición de la proliferación celular observada en presencia de IFN- γ , tal como se mide mediante fluorescencia en el ensayo de A549 (ejemplo 6) o un ensayo similar, en al menos aproximadamente el 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 100% o más cuando la concentración de IFN- γ está dentro de un intervalo, por ejemplo, a aproximadamente la CE₈₀ o la CE₉₀, en el que pueden evidenciarse fácilmente los efectos de un agente que inhibe su actividad biológica. Una CE₈₀, tal como se pretende en el presente documento, es la cantidad de IFN- γ requerida para que se observe el 80% del efecto máximo de IFN- γ . Si la concentración de IFN- γ es bastante superior a la CE₉₀, los efectos de un agente de inhibición pueden ser menos evidentes debido al exceso de IFN- γ . La concentración de un anticuerpo requerido para inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ puede variar en gran medida y puede depender de cómo de estrechamente se una el anticuerpo a IFN- γ . Por ejemplo, puede ser suficiente una molécula o menos de un anticuerpo por molécula de IFN- γ para inhibir o modular la actividad biológica en el ensayo de A549. En algunas realizaciones, puede requerirse una razón de IFN- γ :anticuerpo de aproximadamente 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:100 ó 1:50.000 para inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ cuando la concentración de IFN- γ es de desde aproximadamente la CE₅₀ hasta aproximadamente la CE₉₀. También son posibles razones de IFN- γ :anticuerpo entre estos valores.

En realizaciones adicionales, las variantes de anticuerpo pueden incluir anticuerpos que comprenden un fragmento Fc modificado o una región constante de cadena pesada modificada. Puede modificarse un fragmento Fc, que significa “fragmento que cristaliza”, o una región constante de cadena pesada mediante mutación para conferir a un anticuerpo características alteradas. Véanse, por ejemplo, Burton y Woof, 1992, *Advances in Immunology* 51:1-84; Ravetch y Bolland, 2001, *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-90; Shields *et al.*, 2001, *Journal of Biol. Chem.* 276:6591-6604; Telleman y Junghans, 2000, *Immunology* 100:245-251; Medesan *et al.*, 1998, *Eur. J. Immunol.* 28:2092-2100). Tales mutaciones pueden incluir sustituciones, adiciones, deleciones, o cualquier combinación de las mismas, y se producen normalmente mediante mutagénesis dirigida al sitio usando uno o más oligonucleótido(s) mutagénico(s) según los métodos descritos en el presente documento, así como según los métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 3ª Ed., 2001, Cold Spring Harbor, N. Y. y Berger y Kimmel, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA.).

En determinadas realizaciones, las variantes de anticuerpo incluyen variantes de glicosilación en las que se ha alterado el número y/o el tipo de sitio de glicosilación en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes de proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en las que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un posible nuevo sitio para la adición de una cadena de hidrato de carbono unida a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia retirarán una cadena de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona una redistribución de las cadenas de hidrato de carbono unidas a N en las que se elimina(n) uno o más sitios de glicosilación unidos a N (normalmente aquellos que se producen de manera natural) y se crea(n) uno o más sitios unidos a N. Variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que uno o más residuos de cisteína se deleciona(n) de o se sustituye(n) por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando deben plegarse de nuevo los anticuerpos en una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y tienen normalmente un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas no apareadas.

El término “agente” se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “marcador” o “marcado” se refiere a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado, o la unión a un polipéptido o ácido nucleico de un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o una enzima que tiene una actividad detectable, o la unión a un polipéptido de restos de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que comprende preferiblemente un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o una actividad enzimática que puede detectarse, entre otros, mediante métodos ópticos y colorimétricos). En determinadas realizaciones, el marcador también puede ser un agente terapéutico. En la técnica se conocen diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y pueden usarse ventajosamente en los métodos dados a conocer en el presente documento. Los ejemplos de marcadores para detectar polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína o FITC, rodamina o fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, marcadores de hapteno tales como grupos biotinilo, y epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales o etiquetas de epítopos). En determinadas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores (tales como (CH₂)_n, en el que n < aproximadamente 20) de diversas longitudes para reducir un posible impedimento estérico.

ES 2 370 473 T3

La expresión “muestra biológica”, tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o un ser que estuvo vivo anteriormente. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos y piel.

5

La expresión “fármaco o agente farmacéutico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o una composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

10 La expresión “enfermedad mediada por IFN- γ ” incluye, pero no se limita a, enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunitarias. Una “enfermedad autoinmunitaria” tal como se usa en el presente documento se refiere a las afecciones y los estados patológicos en los que la respuesta inmunitaria de un paciente se dirige hacia los propios constituyentes del paciente. Por ejemplo, las enfermedades mediadas por IFN- γ incluyen, pero no se limitan a, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), artritis reumatoide incluyendo artritis reumatoide juvenil, enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, diabetes (tipo 1), epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, artritis psoriásica, aterosclerosis, resistencia a eritropoyetina, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante, lesión hepática inducida por hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar, lesión del hígado inducida por alcohol incluyendo cirrosis alcohólica, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías incluyendo espondilitis anquilosante, tiroiditis y vasculitis. La expresión “enfermedad mediada por IFN- γ ” también engloba cualquier afección médica asociada con niveles aumentados de IFN- γ o sensibilidad aumentada a IFN- γ .

25 El tratamiento de una enfermedad mediada por IFN- γ , incluyendo una enfermedad autoinmunitaria, engloba el alivio de al menos un síntoma del trastorno, una reducción en la gravedad de la enfermedad, o el retraso o la prevención de la evolución a una enfermedad más grave que se produce con alguna frecuencia tras la afección tratada. El tratamiento no es necesario que signifique que la enfermedad se cura por completo. Un agente terapéutico útil sólo es necesario que reduzca la gravedad de una enfermedad, reduzca la intensidad de un síntoma o síntomas asociados con la enfermedad o su tratamiento, o proporcione una mejora a la calidad de vida del paciente, o retrase el inicio de una enfermedad más grave que puede producirse con cierta frecuencia tras la afección tratada. Por ejemplo, si la enfermedad es una artritis reumatoide, un agente terapéutico puede disminuir la hinchazón de las articulaciones, reducir el número de articulaciones afectadas, o retrasar o inhibir la pérdida ósea. Un paciente con LES puede tener síntomas tales como lesiones de la piel, fiebre, debilidad, artritis, linfadenopatía, pleuresía, pericarditis y/o anemia, entre otros. Pueden evaluarse tales síntomas mediante cualquiera de varias técnicas convencionales incluyendo, por ejemplo, observación visual, fotografía, medición de la temperatura, fuerza de prensión o tamaño de la articulación, y/o examen microscópico de sangre para determinar la concentración de glóbulos rojos. Se describe un método de tratamiento que comprende administrar a un paciente aquejado de una enfermedad mediada por IFN- γ , un anticuerpo contra IFN- γ de la invención en una cantidad y durante un tiempo suficientes para inducir una mejora sostenida con respecto al nivel inicial de un indicador que refleja la gravedad de un trastorno particular o la intensidad de síntomas provocados por el trastorno o retrasar o prevenir el inicio de una enfermedad más grave que sigue a la afección tratada en algunos o todos los casos. Esta invención no excluye el posible tratamiento con otros agentes terapéuticos antes, después y/o durante el tratamiento con el anticuerpo contra IFN- γ .

45 Tal como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” o “sustancialmente purificado” significa un compuesto o una especie que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En determinadas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En determinadas realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 95% o el 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En determinadas realizaciones, se purifica la especie hasta homogeneidad esencial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante los métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una especie macromolecular individual.

55 El término “paciente” incluye ser humano y sujetos animales.

A menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades.

60 Dado que el IFN- γ es una citocina con múltiples funciones, que incluyen proteger el cuerpo frente a la infección viral y regular varios aspectos de la respuesta inmunitaria, la actividad aumentada de IFN- γ puede contribuir a varios estados patológicos. Según determinadas realizaciones, pueden usarse anticuerpos dirigidos frente a IFN- γ para tratar enfermedades mediadas por IFN- γ , incluyendo pero sin limitarse a, las mencionadas anteriormente.

65 En un aspecto, se describen anticuerpos monoclonales completamente humanos producidos contra y que tienen especificidad biológica e inmunológica para la unión específica a IFN- γ humano. Se describen regiones variables (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31) incluidas en tales anticuerpos, cadenas pesadas y ligeras completas de tales anticuerpos (SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22), y anticuerpos que

ES 2 370 473 T3

comprenden CDR específicas (CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada y ligera; SEQ ID NO: 34 a SEQ ID NO: 44). Realizaciones particulares de este aspecto son secuencias correspondientes a las CDR, específicamente CDR1 a CDR3, de las cadenas pesada y ligera descritas. Además, se describen anticuerpos que comprenden una secuencia de CDR3 dada a conocer en el presente documento (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 43 y/o SEQ ID NO: 44) que pueden contener también secuencias idénticas en al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a cualquiera de las secuencias de región variable o secuencias de cadena pesada o ligera completas dadas a conocer en el presente documento, en los que el anticuerpo puede inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ .

En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados o polinucleótidos que codifican para los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos de la invención pueden unirse específicamente a y/o inhibir o modular la actividad biológica de IFN- γ . Específicamente, se describen polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, y/o secuencias que son al menos idénticas en el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a estas secuencias, en los que la alineación entre las secuencias anteriores y la secuencia de prueba abarca al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos. Además, se describen polinucleótidos que comprenden las SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y/o SEQ ID NO: 48, que codifican para anticuerpos que pueden unirse específicamente a y/o inhiben o modulan la actividad biológica de IFN- γ . Además, se describen polinucleótidos que son al menos idénticos en el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o aproximadamente el 99% a las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33, en los que un anticuerpo codificado en parte por cada uno de estos polinucleótidos puede inhibir o modular la actividad biológica de y/o unirse específicamente a IFN- γ y en los que la alineación entre las secuencias de nucleótidos nombrados inmediatamente antes y la secuencia de prueba abarca al menos aproximadamente 100, 150 ó 200 nucleótidos.

La tabla 2 proporciona una breve descripción de las secuencias ya que se relacionan con sus números de identificación de secuencia.

TABLA 2

Breve descripción de la lista de secuencias

Número de identificación de secuencia	Breve descripción
SEQ ID NO: 1	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de cadena pesada del anticuerpo 1118, 1118*, 1119, 1121 ó 1121*
SEQ ID NO: 2	Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada del anticuerpo 1118, 1118*, 1119, 1121 ó 1121*
SEQ ID NO: 3	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de cadena ligera del anticuerpo 1118, 1118*, 1119, 1121 ó 1121*
SEQ ID NO: 4	Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera del anticuerpo 1118, 1118*, 1119, 1121 ó 1121*
SEQ ID NO: 5	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1119
SEQ ID NO: 6	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1119
SEQ ID NO: 7	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1119
SEQ ID NO: 8	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1119
SEQ ID NO: 9	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1118

ES 2 370 473 T3

	SEQ ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1118
5	SEQ ID NO: 11	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1118 ó 1118*
	SEQ ID NO: 12	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1118 ó 1118*
10	SEQ ID NO: 13	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1121 ó 1121*
	SEQ ID NO: 14	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1121 ó 1121*
15	SEQ ID NO: 15	Secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1121
	SEQ ID NO: 16	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1121
20	SEQ ID NO: 17	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa del anticuerpo 1119
	SEQ ID NO: 18	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera completa del anticuerpo 1119
25	SEQ ID NO: 19	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa del anticuerpo 1118
	SEQ ID NO: 20	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera completa del anticuerpo 1118 ó 1118*
30	SEQ ID NO: 21	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa del anticuerpo 1121 ó 1121*
	SEQ ID NO: 22	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera completa del anticuerpo 1121
	SEQ ID NO: 23	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
35	SEQ ID NO: 24	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
	SEQ ID NO: 25	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
40	SEQ ID NO: 26	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
	SEQ ID NO: 27	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
	SEQ ID NO: 28	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
45	SEQ ID NO: 29	Secuencia de nucleótidos de un cebador de PCR
	SEQ ID NO: 30	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1118*
50	SEQ ID NO: 31	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1121*
	SEQ ID NO: 32	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa del anticuerpo 1118*
55	SEQ ID NO: 33	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera completa del anticuerpo 1121*
	SEQ ID NO: 34	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 1119, 1118, 1118*, 1121 ó 1121*
60	SEQ ID NO: 35	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 1119, 1118, 1118*, 1121 ó 1121*
65	SEQ ID NO: 36	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1119

ES 2 370 473 T3

5	SEQ ID NO: 37	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1118, 1118*, 1121 ó 1121*
	SEQ ID NO: 38	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 1119 ó 1121
	SEQ ID NO: 39	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 1118 ó 1118*
10	SEQ ID NO: 40	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 1121*
	SEQ ID NO: 41	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 1119, 1118, 1118* ó 1121
15	SEQ ID NO: 42	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 1121*
	SEQ ID NO: 43	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 1119, 1118, 1118* ó 1121
20	SEQ ID NO: 44	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 1121*
	SEQ ID NO: 45	Secuencia de nucleótidos que codifica para la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1119
25	SEQ ID NO: 46	Secuencia de nucleótidos que codifica para la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1118, 1118*, 1121 ó 1121*
	SEQ ID NO: 47	Secuencia de nucleótidos que codifica para la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 1118, 1118*, 1119 ó 1121
30	SEQ ID NO: 48	Secuencia de aminoácidos que precede inmediatamente a una CDR1 de cadena pesada
	SEQ ID NO: 49	Secuencia de aminoácidos que puede preceder inmediatamente a una CDR2 de cadena pesada
35	SEQ ID NO: 50	Secuencia de aminoácidos que casi siempre sigue a una CDR3 de cadena pesada
40	SEQ ID NO: 51	Secuencia de aminoácidos que habitualmente sigue a una CDR3 de cadena ligera
	SEQ ID NO: 52	Secuencia de aminoácidos de una secuencia señal
	SEQ ID NO: 53	Secuencia de aminoácidos de una secuencia señal
45	SEQ ID NO: 54	Secuencia de aminoácidos de una secuencia señal
	SEQ ID NO: 55	Secuencia de aminoácidos de una secuencia señal
50	SEQ ID NO: 56	Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1118*
55	SEQ ID NO: 57	Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1121*

60 Aún en otro aspecto, la invención proporciona células de hibridoma y líneas celulares que expresan las moléculas de inmunoglobulinas y los anticuerpos de la invención, opcionalmente anticuerpos monoclonales. En un aspecto adicional, puede implantarse una célula de hibridoma o una célula de una línea celular que expresa y/o secreta una molécula de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención en un paciente, mediante lo cual un anticuerpo de la invención o fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo se expresa y/o secreta en el paciente, inhibiendo o modulando de ese modo la actividad de IFN- γ .

65 La invención también proporciona preparaciones de anticuerpos purificados de manera biológica e inmunológica, preferiblemente anticuerpos monoclonales producidos contra y que tienen especificidad biológica e inmunológica para la unión específicamente a IFN- γ humano.

La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos del tamaño de megabases en cromosomas artificiales de levadura (YAC) e introducirlos en la línea germinal de ratón permite el desarrollo de un enfoque ventajoso para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o mapeados de modo rudimentario así como la generación de modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de una tecnología de este tipo para la sustitución de loci de ratón por sus equivalentes humanos produce conocimientos únicos sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su participación en la inducción y la evolución de enfermedades.

Una aplicación práctica importante de una estrategia de este tipo es la alteración del sistema inmunitario humoral del ratón mediante la introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que se han inactivado genes de Ig endógena. La solicitud internacional n.º WO 93/12227. Este sistema ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión y el ensamblaje programados de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, una estrategia de este tipo proporciona una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) completamente humanos. Se espera que los AcM completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas frente a AcM de ratón o derivados de ratón, y aumenten de ese modo la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Pueden usarse anticuerpos completamente humanos en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como osteoartritis, artritis reumatoide y otros estados inflamatorios, requiriendo el tratamiento de los mismos la administración repetida de anticuerpos. Por tanto, una ventaja particular de los anticuerpos anti-IFN- γ de la invención es que los anticuerpos son completamente humanos y pueden administrarse a pacientes de manera no aguda mientras se minimizan las reacciones adversas asociadas comúnmente con los anticuerpos de ratón anti-humano u otros anticuerpos no humanos o no completamente humanos descritos previamente procedentes de especies no humanas.

Usando los métodos expuestos en el presente documento, un experto en la técnica puede modificar mediante ingeniería genética variedades de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humanas de manera que tales ratones produzcan anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Grandes fragmentos de Ig humanas pueden conservar la gran diversidad génica variable así como la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria celular del ratón para la selección y diversificación de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica para proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas variedades de ratón produce anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología del hibridoma, pueden producirse y seleccionarse AcM humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

En determinadas realizaciones, el experto puede usar regiones constantes de especies distintas a la humana junto con la(s) región/regiones variable(s) humana(s) en tales ratones para producir anticuerpos quiméricos.

Estructura de anticuerpo que se produce de manera natural

La mayor parte de las unidades estructurales de anticuerpos que se producen de manera natural comprenden normalmente un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros se compone normalmente de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" de longitud completa (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena ligera y pesada incluye normalmente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que normalmente es responsable del reconocimiento de antígenos. La parte carboxi-terminal de cada cadena define normalmente una región constante responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican normalmente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de manera similar en subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, normalmente, las regiones variables y constantes se unen mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Cap. 7, 2ª ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N. Y. Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada normalmente forman el sitio de unión a antígenos.

Algunos anticuerpos que se producen de manera natural, que se han encontrado en camellos y llamas, son dímeros que consisten en dos cadenas pesadas y no incluyen cadenas ligeras. Muldermans *et al.*, 2001, J. Biotechnol. 74:277-302; Desmyter *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276:26285-90. La invención abarca anticuerpos dímicos que consisten en dos cadenas pesadas que pueden unirse a y/o inhibir la actividad biológica del IFN- γ . Un estudio cristalográfico de un anticuerpo de camello ha revelado que la CDR3 de cadena pesada, que es de 19 aminoácidos de longitud, forma una superficie que interacciona con el antígeno y cubre las otras dos regiones hipervariables. Desmyter *et al.*, citado anteriormente. Por tanto, CDR3 es importante para la unión de antígenos en anticuerpos dímicos de camello, así como en los anticuerpos tetraméricos más típicos.

Las regiones variables muestran normalmente la misma estructura general de las regiones de entramado (FR, *framework regions*) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se incluyen normalmente den-

tro de las regiones de entramado, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N-terminal al C-terminal, las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la pesada comprenden normalmente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es normalmente según las definiciones de Kabat *et al.*, según se explica en más detalle a continuación. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md.); véanse también Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, Nature 342:878-883. Las CDR constituyen los principales puntos de contacto con la superficie para la unión a antígenos. Véase por ejemplo Chothia y Lesk, citado anteriormente. Además, la CDR3 de la cadena ligera y, especialmente, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión a antígenos dentro de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Véase por ejemplo Chothia y Lesk, citado anteriormente; Desiderio *et al.* (2001), J. Mol. Biol. 310:603-15; Xu y Davis (2000), Immunity 13 (1):37-45; Desmyter *et al.* (2001), J. Biol. Chem. 276 (28):26285-90; y Muyldermans (2001), J. Biotechnol. 74 (4):277-302. En algunos anticuerpos, la CDR3 de cadena pesada parece constituir el área de contacto principal entre el antígeno y el anticuerpo. Desmyter *et al.*, citado anteriormente. Pueden usarse esquemas de selección *in vitro* en los que se varía la CDR3 sola para variar las propiedades de unión de un anticuerpo. Muyldermans, citado anteriormente; Desiderio, citado anteriormente.

Las CDR pueden ubicarse en una secuencia de región variable de cadena pesada de la siguiente manera. CDR1 comienza aproximadamente en el residuo 31 del anticuerpo maduro y es habitualmente de aproximadamente 5-7 aminoácidos de longitud, y está precedida casi siempre por un Cys-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx (SEQ ID NO: 48) (en la que "Xxx" es cualquier aminoácido). El residuo que sigue a la CDR1 de cadena pesada es casi siempre un triptófano, a menudo un Typ-Val, un Trp-Ile o un Trp-Ala. Casi siempre hay catorce aminoácidos entre el último residuo en CDR1 y el primero en CDR2, y CDR2 normalmente contiene de 16 a 19 aminoácidos. CDR2 puede estar precedida inmediatamente por Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO: 49) y puede estar seguida inmediatamente por Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. Otros aminoácidos pueden preceder o seguir a CDR2. Casi siempre hay treinta y dos aminoácidos entre el último residuo en CDR2 y el primero en CDR3, y CDR3 puede ser de desde aproximadamente 3 hasta 25 residuos de longitud. Un Cys-Xxx-Xxx precede casi siempre inmediatamente a CDR3, y un Trp-Gly-Xxx-Gly (SEQ ID NO: 50) sigue casi siempre a CDR3.

Las CDR de cadena ligera pueden ubicarse en una secuencia de cadena ligera de la siguiente manera. CDR1 comienza aproximadamente en el residuo 24 del anticuerpo maduro y es habitualmente de aproximadamente 10 a 17 residuos de longitud. Casi siempre está precedida por una Cys. Casi siempre hay 15 aminoácidos entre el último residuo de la CDR1 y el primer residuo de la CDR2, y CDR2 es casi siempre de 7 residuos de longitud. CDR2 está precedida normalmente por Ile-Tyr, Val-Tyr, Ile-Lys, o Ile-Phe. Casi siempre hay 32 residuos entre la cadena ligera CDR2 y CDR3, y CDR3 es habitualmente de aproximadamente 7 a 10 aminoácidos de longitud. CDR3 está precedida casi siempre por Cys y habitualmente seguida por Phe-Gly-Xxx-Gly (SEQ ID NO: 51).

Un experto en la técnica se dará cuenta de que las longitudes de las regiones de entramado que rodean las CDR pueden contener inserciones o deleciones que hacen que su longitud difiera de la que es típica. Tal como se pretende en el presente documento, la longitud de las regiones de entramado de cadena pesada se encuentra dentro de los siguientes intervalos: FR1, de 0 a 41 aminoácidos; FR2, de 5 a 24 aminoácidos; FR3, de 13 a 42 aminoácidos; y FR4, de 0 a 21 aminoácidos. Además, la invención contempla que las longitudes de regiones de entramado de cadena ligera se encuentran dentro de los siguientes intervalos: FR1, de 6 a 35 aminoácidos; FR2, de 4 a 25 aminoácidos; FR3, de 2 a 42 aminoácidos; y FR4, de 0 a 23 aminoácidos.

Los anticuerpos que se producen de manera natural incluyen normalmente una secuencia señal, que dirige el anticuerpo hacia la ruta celular para la secreción de proteínas y que no está presente en el anticuerpo maduro. Un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de la invención puede codificar para una secuencia señal que se produce de manera natural o una secuencia señal heteróloga tal como se describe a continuación.

50 *Maduración in vitro de anticuerpos*

Los anticuerpos pueden madurar *in vitro* para producir anticuerpos con propiedades alteradas, tales como una mayor afinidad por un antígeno o una menor constante de disociación. La variación sólo de residuos dentro de las CDR, particularmente las CDR3, puede dar como resultado anticuerpos alterados que se unen al mismo antígeno, pero con mayor afinidad. Véase por ejemplo Schier *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 263:551-67; Yang *et al.*, 1995, J. Mol. Biol. 254:392-403. La invención abarca anticuerpos creados mediante una variedad de esquemas de selección *in vitro*, tales como maduración de afinidad y/o intercambio de cadenas (Kang *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-23), o intercambio de ADN (Stemmer, 1994, Nature 370:389-391), mediante los cuales pueden seleccionarse anticuerpos que tienen propiedades ventajosas. En muchos esquemas, se aleatoriza un anticuerpo I conocido en determinadas posiciones, a menudo dentro de las CDR, *in vitro* y se somete a un proceso de selección mediante el cual pueden aislarse anticuerpos con propiedades deseadas, tales como un aumento de afinidad por un determinado antígeno. Véanse por ejemplo van den Beucken *et al.*, 2001, J. Mol. Biol. 310:591-601; Desiderio *et al.*, 2001, J. Mol. Biol. 310:603-15; Yang *et al.*, 1995, J. Mol. Biol. 254:392-403; Schier *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 263:551-67. Normalmente, tales anticuerpos mutados pueden comprender varios residuos alterados en una o más CDR, dependiendo del diseño de las etapas de mutagénesis y de selección. Véase por ejemplo van den Beucken *et al.*, citado anteriormente.

Anticuerpos biespecíficos o bifuncionales

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional normalmente es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/cadena ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos incluyendo, pero sin limitarse a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos F(ab'). Véanse, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

10 *Preparación de anticuerpos*

Se describen anticuerpos que se unen específicamente a IFN- γ humana. Estos anticuerpos pueden producirse mediante inmunización con IFN- γ de longitud completa o fragmentos del mismo. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. En determinadas realizaciones, se preparan anticuerpos completamente humanos, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos que pueden producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO 93/12227).

Las CDR de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos anti-IFN- γ de la invención pueden injertarse en regiones de entramado (FR) para la misma, u otra, especie. En determinadas realizaciones, las CDR de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo anti-IFN- γ pueden injertarse en FR humanas consenso para crear un anticuerpo "humanizado". Tales anticuerpos humanizados están englobados en la presente invención. Para crear FR humanas consenso, se alinean las FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera humanas para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. Las FR de la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo anti-IFN- γ pueden sustituirse por FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. Los aminoácidos raros en las FR de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo anti-IFN- γ normalmente no se sustituyen, mientras que puede sustituirse el resto de los aminoácidos de FR. Los aminoácidos raros son aminoácidos específicos que están en posiciones en las que no se encuentran habitualmente en las FR. Las regiones variables injertadas procedentes de anticuerpos anti-IFN- γ de la invención pueden usarse con una región constante que es diferente de una región constante original de un anticuerpo anti-IFN- γ . Alternativamente, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. Se describe el injerto de CDR, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 y 5.530.101.

Pueden prepararse anticuerpos de la invención usando ratones transgénicos que tienen una parte sustancial del locus que produce anticuerpos humanos insertado en células productoras de anticuerpos de los ratones, y que se modifican adicionalmente mediante ingeniería genética para que sean deficientes en la producción de anticuerpos murinos, endógenos. Tales ratones pueden producir moléculas de inmunoglobulinas y anticuerpos humanos y no producen o producen cantidades sustancialmente reducidas de moléculas de inmunoglobulinas y anticuerpos murinos. Se dan a conocer las tecnologías utilizadas para lograr este resultado en las patentes, solicitudes y referencias dadas a conocer en la memoria descriptiva del presente documento. En determinadas realizaciones, el trabajador experto puede emplear métodos tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 98/24893. Véase también Mendez *et al.*, 1997, Nature Genetics 15:146-156.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional para anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas habitual de Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Un posible sistema animal para preparar hibridomas es el ratón. La producción de hibridomas en el ratón está muy bien establecida, y se conocen bien en la técnica protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

En algunas realizaciones, pueden generarse anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos contra IFN- γ , opcionalmente IFN- γ humano, usando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, denominados en el presente documento ratones "HuMab", contienen un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica para secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y cadena pesada (μ y γ) humanas no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368:856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o κ de ratón y en respuesta a la inmunización los transgenes de cadena pesada y cadena ligera humanas introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales contra κ de IgG humana de alta afinidad (Lonberg *et al.*, citado anteriormente; Lonberg y Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding y Lonberg, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación de ratones HuMab se describe en detalle en Taylor *et al.*, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295; Chen *et al.*, 1993, International Immunology 5:647-656; Tuailon *et al.*, 1994, J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg & Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding & Lonberg, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851. Véanse además las patentes estadounidenses

ES 2 370 473 T3

n.^{os} 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas concedidas a Lonberg y Kay, así como la patente estadounidense n.º 5.545.807 concedida a Surani *et al.*; las publicaciones de solicitud de patente internacional n.^{os} WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22646, publicada el 23 de diciembre de 1992; y WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992. Alternativamente, pueden usarse las variedades de ratones transgénicos HCo7 y HCo12 descritas en los ejemplos a continuación para generar anticuerpos anti-IFN- γ humanos.

En estas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a IFN- γ con una constante de disociación de equilibrio (K_D) inferior a 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M. En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos se unen a IFN- γ con una K_D de entre aproximadamente 10^{-8} M y 10^{-12} M.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. Los anticuerpos pueden ser del isotipo IgG1. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgM, IgA, IgE o IgD. En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos comprenden una cadena ligera kappa humana y cadena pesada de IgG1 humana. La expresión de anticuerpos de la invención que comprenden una región constante de cadena pesada de IgG1 se describe en los ejemplos a continuación. En realizaciones particulares, las regiones variables de los anticuerpos se ligan a una región constante distinta a la región constante para el isotipo IgG1. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se han clonado para la expresión en células de mamífero.

En determinadas realizaciones, modificaciones conservativas a las cadenas pesadas y cadenas ligeras del anticuerpo anti-IFN- γ (y las modificaciones correspondientes a los nucleótidos que lo codifican) producirán anticuerpos anti-IFN- γ que tienen características químicas y funcionales similares a las del anticuerpo anti-IFN- γ . En contraposición, pueden realizarse modificaciones sustanciales en las características químicas y/o funcionales del anticuerpo anti-IFN- γ seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura principal molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, como lámina β o conformación helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

Por ejemplo, una “sustitución de aminoácido conservativa” puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo de manera que hay un pequeño o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede sustituirse por alanina, tal como se ha descrito anteriormente para “mutagénesis de exploración de alanina”.

Pueden determinarse sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) por los expertos en la técnica en el momento que se deseen tales sustituciones. En determinadas realizaciones, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar residuos importantes de anticuerpo anti-IFN- γ , o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos anti-IFN- γ descritos en el presente documento.

En realizaciones alternativas, pueden expresarse anticuerpos de la invención en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. En estas realizaciones, pueden usarse secuencias que codifican para anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. Según estas realizaciones, puede lograrse la transformación usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, tal como se pone como ejemplo en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Generalmente, el procedimiento de transformación usado puede depender del huésped que va a transformarse. Se conocen bien en la técnica métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Están englobadas por la invención moléculas de ácido nucleico (o polinucleótidos) que codifican para la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-IFN- γ de la invención. Tales polinucleótidos pueden insertarse en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento habituales. En una realización preferida, un polinucleótido que codifica para la región constante de cadena ligera o cadena pesada del anticuerpo anti-IFN- γ se adjunta hacia el extremo en sentido de 3' de un polinucleótido que codifica para la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona normalmente para ser funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de manera que pueda producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Para una revisión de los vectores de expresión, véase METH. ENZ. 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, denominadas conjuntamente “secuencias flanqueantes” en determinadas realizaciones incluirán normalmente una o más de las secuencias de nucleótidos siguientes: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme aceptor y donador, una secuencia que codifica para una secuencia líder para la secreción de polipéptido, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de unión múltiple para

ES 2 370 473 T3

insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que va a expresarse y un elemento marcador de selección. Se trata cada una de estas secuencias a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica para “etiqueta”, es decir, una molécula de oligonucleótido ubicada en el extremo 3' ó 5' de la secuencia codificante de polipéptido de anticuerpo anti-IFN- γ ; la secuencia de oligonucleótido codifica para polyHis (tal como hexaHis), u otra “etiqueta” tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus influenza), o myc, para la que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente al polipéptido con la expresión del polipéptido, y puede servir como un medio para purificación por afinidad o detección del anticuerpo IFN- γ de la célula huésped. La purificación por afinidad puede lograrse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente del polipéptido de anticuerpo anti-IFN- γ purificado mediante diversos medios tales como usar determinadas peptidasas para la escisión.

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

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse mediante cualquiera de los diversos métodos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento se habrán identificado anteriormente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y por tanto pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En el presente documento, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos descritos en el presente documento para clonación o síntesis de ácido nucleico.

Si se conoce toda o sólo una parte de la secuencia flanqueante, puede obtenerse usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o mediante rastreo de una genoteca con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante de la misma especie o de otra. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de un trozo más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. Puede lograrse el aislamiento mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido por aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto. La selección de enzimas adecuadas para lograr este fin resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica.

Un origen de replicación es normalmente una parte de los vectores de expresión procariontas adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, puede sintetizarse uno químicamente basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, y diversos orígenes virales (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VEV), o papilomavirus tales como VPH o VPB) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 se usa a menudo sólo porque también contiene el promotor temprano del virus).

Una secuencia de terminación de la transcripción se ubica normalmente en el extremo 3' de una región codificante de polipéptido y sin/e para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariontas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia de poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los que se describen en el presente documento.

Un gen marcador de selección codifica para una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped hecha crecer en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huésped procariontas; (b) complementan deficiencias auxotrofas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios definidos o complejos. Marcadores de selección preferidos son el gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Ventajosamente, también puede usarse un gen de resistencia a la neomicina para la selección en células huésped tanto procariontas como eucariotas.

Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en el que los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia de la célula se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes sin promotor de timidina quinasa. Se ponen los transformantes de célula de mamífero bajo presión de selección

en el que sólo los transformantes están adaptados para sobrevivir excepcionalmente en virtud del gen de selección presente en el vector. Se impone la presión de selección mediante el cultivo de células transformadas en condiciones en las que se aumenta sucesivamente la concentración del agente de selección en el medio, lo que conduce de ese modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica para otro gen, tal como un anticuerpo que se une al polipéptido de IFN- γ . Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de un polipéptido tal como un anticuerpo anti-IFN- γ a partir del ADN amplificado.

Un sitio de unión al ribosoma es necesario habitualmente para la iniciación de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento se ubica normalmente en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que va a expresarse.

En algunos casos, tales como cuando se desea glicosilación en un sistema de expresión de célula huésped eucariota, pueden manipularse las diversas pre- o pro-secuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de escisión de peptidasas de un péptido señal particular, o añadirse pro-secuencias, que también pueden afectar a la glicosilación. El producto de proteína final puede tener, en la posición -1 (relativo al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes en la expresión, que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos residuos de aminoácido que se encuentran en el sitio de escisión de peptidasas, unido(s) al extremo amino-terminal. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión enzimáticos puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en tal zona dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión y clonación de la invención contendrán normalmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se liga operativamente a la molécula que codifica para el anticuerpo anti-IFN- γ . Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas en el sentido de 5' (es decir, en 5') con respecto al codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan de manera convencional en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otra parte, transcriben uniformemente el gen al que están ligados operativamente, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión del gen. Se conocen bien un gran número de promotores, reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped. Un promotor adecuado se liga operativamente al ADN que codifica para la cadena pesada o cadena ligera que comprende un anticuerpo anti-IFN- γ de la invención eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e inserción de la secuencia promotora deseada en el vector.

También se conocen bien en la técnica promotores adecuados para su uso con huéspedes de levadura. Se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura. Se conocen bien promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero no se limitan a: promotor temprano de SV40 (Benoist y Chambón, 1981, *Nature* 290:304-10); promotor de CMV (Thomsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. USA* 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); secuencias reguladoras y promotoras del gen de la metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); o el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción de animales, que muestran especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa 1 que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); la región de control del gen de la beta-globina que es activa en células mieloides (Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); la región de control del gen de cadena ligera 2 de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en el hipotálamo (Masón *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

ES 2 370 473 T3

Una secuencia potenciadora puede insertarse en el vector para aumentar la transcripción de ADN que codifica para cadena ligera o cadena pesada que comprende un anticuerpo anti-IFN- γ de la invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en posiciones tanto 5' como 3' con respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usa un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus y potenciadores de adenovirus que se conocen en la técnica son elementos potenciadores a modo de ejemplo para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede situarse en el vector o bien en 5' o bien en 3' con respecto a una secuencia codificante, se ubica normalmente en un sitio en 5' con respecto al promotor.

Una secuencia que codifica para una secuencia señal heteróloga o nativa apropiada (secuencia líder o péptido señal) puede incorporarse en un vector de expresión, para promover la secreción extracelular del anticuerpo. La elección del péptido señal o líder depende del tipo de células huésped en las que va a producirse el anticuerpo, y una secuencia señal heteróloga puede reemplazar la secuencia señal nativa. Los ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células huésped de mamífero incluyen los siguientes: la secuencia señal para interleucina-7 (IL-7) descrita en la patente estadounidense n.º 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleucina-2 descrita en Cosman *et al.* (1984, Nature 312:768); el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la patente europea n.º 0 367 566; el péptido señal del receptor de interleucina-1 tipo I descrito en la patente estadounidense n.º 4.968.607; el péptido señal del receptor de interleucina-1 tipo II descrito en la patente europea n.º 0 460 846; la secuencia señal de IgK humana (que es METDTLLLWVLLLWVPGSTG; SEQ ID NO: 52); la secuencia señal de la hormona de crecimiento humana (que es MATGSRSTLLAFGLLCLPWLQEGSA; SEQ ID NO: 53); y las secuencias señal humanas MGSTAILALLAVLQGVCA (SEQ ID NO: 54) y METPAQLLFLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 55), que estaban codificadas por ADNc que codificaban para las cadenas ligera y pesada aisladas en el ejemplo 3.

Los vectores de expresión de la invención pueden construirse a partir de un vector inicial tal como un vector disponible comercialmente. Tales vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas.

Cuando ya no están presentes en el vector una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento, pueden obtenerse individualmente y ligarse al vector. Los métodos usados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes se conocen bien por un experto en la técnica.

Tras haberse construido el vector y haberse insertado una molécula de ácido nucleico que codifica para cadena ligera, una cadena pesada, o una cadena ligera y una cadena pesada que comprenden un anticuerpo anti-IFN- γ en un sitio apropiado del vector, puede insertarse el vector completado en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o expresión de polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo anti-IFN- γ en una célula huésped seleccionada puede lograrse mediante métodos bien conocidos incluyendo transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano, u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que vaya a usarse. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen bien por el experto, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

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

Líneas celulares de mamífero disponibles como huésped para expresión se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares inmortalizadas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo pero sin limitarse a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras líneas celulares varias. En determinadas realizaciones, pueden seleccionarse las líneas celulares mediante la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen de manera constitutiva anticuerpos con propiedades de unión a IFN- γ . En otra realización, puede seleccionarse una línea celular del linaje de células B que no produce su propio anticuerpo pero que tiene la capacidad para producir y secretar un anticuerpo heterólogo.

Los anticuerpos de la invención son útiles para detectar IFN- γ en muestras biológicas e identificar células o tejidos que producen proteína IFN- γ . Los anticuerpos de la invención que específicamente se unen a IFN- γ pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por IFN- γ . Dichos anticuerpos pueden usarse en ensayos de unión para detectar IFN- γ y para inhibir que IFN- γ forme un complejo con receptores IFN- γ . Dichos anticuerpos que se unen a IFN- γ y bloquean la interacción con otros compuestos de unión pueden tener uso terapéutico en modular las enfermedades mediadas por IFN- γ . En realizaciones preferidas, los anticuerpos frente a IFN- γ pueden bloquear la unión de IFN- γ a su receptor, lo que puede dar como resultado la alteración de la cascada de transducción de señales inducida por IFN- γ .

ES 2 370 473 T3

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o una pluralidad de los anticuerpos de la invención junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, los materiales de formulación aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. En realizaciones preferidas, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-IFN- γ .

En determinadas realizaciones, los materiales de formulación aceptables preferiblemente no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En tales realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, mañosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y de dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes de humectación (tales como los Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, Tritón, trometamina, lecitina, colestero, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18a edición, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinadas realizaciones, se determinará la composición farmacéutica óptima por parte de un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente. En determinadas realizaciones, tales composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de aclaramiento *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En determinadas realizaciones, el portador o vehículo primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, complementado posiblemente con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina o solución salina tamponada neutra mezcladas con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En determinadas realizaciones de la invención, las composiciones de anticuerpo anti-IFN- γ pueden prepararse para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente) en forma de un compactado liofilizado o una disolución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, el producto de anticuerpo anti-IFN- γ puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de los conocimientos de la técnica.

Los componentes de la formulación están presentes preferiblemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición en un pH fisiológico o en un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para usar en esta invención pueden proporcionarse en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral libre de pirógenos, que comprende el anticuerpo anti-IFN- γ deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula el anticuerpo anti-IFN- γ como una disolución estéril, isotónica, conservada apropiadamente. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación sostenida o controlada del producto que pueden administrarse mediante inyección de depósito.

En determinadas realizaciones, puede usarse también ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden usarse dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula de anticuerpo deseada.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para inhalación. En estas realizaciones, los anticuerpos anti-IFN- γ se formulan ventajosamente como un polvo inhalable seco. En realizaciones preferidas, las disoluciones de inhalación de anticuerpo anti-IFN- γ pueden formularse también con un propelente para administración en aerosol. En determinadas realizaciones, las disoluciones pueden nebulizarse. Por tanto, se describen adicionalmente métodos de formulación y administración pulmonar en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

10 También se considera que las formulaciones pueden administrarse por vía oral. Los anticuerpos anti-IFN- γ que se administran en esta manera pueden formularse con o sin portadores usados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, una cápsula puede diseñarse para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal cuando la biodisponibilidad se maximiza y la degradación presistémica se minimiza. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-IFN- γ . También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

20 Se proporciona preferiblemente una composición farmacéutica de la invención para que comprenda una cantidad eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos anti-IFN- γ en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitarias. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

30 Resultarán evidentes composiciones farmacéuticas adicionales para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican anticuerpos anti-IFN- γ en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 3.773.919 y en la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 058481, copolímeros del ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), etileno-acetato de vinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (publicación de solicitud de patente europea n.º EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de los varios métodos conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; publicaciones de solicitud de patente europea n.º EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

45 Las composiciones farmacéuticas usadas para la administración *in vivo* se proporcionan normalmente como preparaciones estériles. La esterilización puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede llevarse a cabo o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

55 Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal, o como un polvo liofilizado o deshidratado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

60 También se describen kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer envase que tiene una proteína seca como un segundo envase que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

65 La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-IFN- γ que va a emplearse dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está utilizándose el anticuerpo anti-IFN- γ , la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede ajustar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico

óptimo. Una dosificación normal puede oscilar desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones preferidas, la dosificación puede oscilar desde 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 30 mg/kg, opcionalmente desde 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 30 mg/kg o desde 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta aproximadamente 5 mg/kg.

5 La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-IFN- γ particular en la formulación usada. Normalmente, un médico clínico administra la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) con el tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implantación o catéter. Se realiza rutinariamente una mejora adicional de la dosificación apropiada por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de tareas realizadas rutinariamente por ellos. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden administrarse a los pacientes a lo largo de un período de tiempo prolongado. La administración crónica de un anticuerpo de la invención minimiza la respuesta alérgica o inmunitaria adversa asociada comúnmente con anticuerpos que se producen contra un antígeno humano en un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo no completamente humano o anticuerpo no humano producido en una especie no humana.

20 La vía de administración de la composición farmacéutica es de acuerdo a los métodos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección mediante vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, infraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

25 La composición también puede administrarse localmente mediante implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinadas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación regulada o administración continua.

30 Puede desearse también usar composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-IFN- γ según la invención *ex vivo*. En tales casos, se exponen células, tejidos u órganos que se han extirpado del paciente a composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-IFN- γ tras lo cual las células, tejidos y/u órganos se implantan de nuevo en el paciente posteriormente.

35 En particular, los anticuerpos anti-IFN- γ pueden administrarse mediante implantación de determinadas células que se han modificado por ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. En determinadas realizaciones, tales células pueden ser células humanas o de animales, y pueden ser autólogas, heterólogas, o xenogénicas. En determinadas realizaciones, las células pueden immortalizarse. En otras realizaciones, con el fin de disminuir el riesgo de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En realizaciones adicionales, los materiales de encapsulación son normalmente biocompatibles, recintos poliméricos semipermeables o membranas que permiten la liberación del/de los producto(s) de proteína pero impiden la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales procedentes de los tejidos circundantes.

45 Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos se proporcionan sólo para fines ilustrativos y no han de interpretarse como limitativos de la invención.

50

Ejemplo 1

Generación de proteína IFN- γ humana a partir de células CHO

55

Se amplificó ADNc de IFN- γ humano de longitud completa mediante PCR (en condiciones habituales) usando ADNc de bazo humano Marathon-Ready (Clontech) como molde. Se subclonó la secuencia en el plásmido pDSR α 2. Se transformaron células DH10B (*Escherichia coli*) con el plásmido pDSR α 2. Se preparó ADN usando técnicas habituales, y se transfetaron células CHO mediante el método con fosfato de calcio (Speciality Media, Inc.). Se usó un clon de línea celular de alta expresión para generar medios condicionados libres de suero.

60

Se concentraron, dializaron y purificaron los medios condicionados de células CHO que contenían IFN- γ humano (hu-IFN- γ) a través de varias etapas cromatográficas. La primera etapa fue cromatografía Q-HP (Pharmacia) usando un gradiente de NaCl patrón para separar formas de hu-IFN- γ altamente glicosiladas de las no glicosiladas. Se purificó además la combinación de Q-HP a través de cromatografía con aglutinina de germen de trigo (EY Laboratories). Se separó el material purificado mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y analizó mediante tinción de plata y azul de Coomassie. El material purificado era puro en más del 95% tal como se determinó mediante SDS-PAGE con tinción tanto de plata como de azul de Coomassie. También se sometió a prueba el material mediante

65

ES 2 370 473 T3

el método gel-coágulo (lisado de amebocitos de *Limulus*), indicando un bajo nivel de endotoxina. Se confirmó la identidad de hu-IFN- γ mediante transferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-AF-285 NA de R & D Systems. Se determinó la concentración de proteína final a partir de la absorbencia (A280) usando el método del coeficiente de extinción, en el que la lectura de A280/coeficiente de extinción = concentración en g/l (coeficiente de extinción = 0,66).

Ejemplo 2

10 *Producción de anticuerpos monoclonales humanos contra IFN- γ*

Ratones HuMab transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a IFN- γ usando las cepas HCo7, HCo12 y HCo7+HCo12 de ratones transgénicos, cada uno de los cuales expresó genes de anticuerpo humano. En cada una de estas cepas, se había alterado de manera homocigota el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno tal como se describe en Chen *et al.* (1993, EMBO J. 12:811-820), y se había alterado de manera homocigota el gen de cadena pesada de ratón endógeno tal como se describe en el ejemplo 1 de la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 01/09187. Cada cepa portaba un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild *et al.* (1996, Nature Biotechnology 14:845-851). La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada humana HCo7 tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806, 5.625.825 y 5.545.807.

La cepa HCo12 portaba el transgén de cadena pesada humana HCo12 tal como se describe en el ejemplo 2 de la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 01/09187. La cepa HCo7+HCo12 llevaba ambos transgenes de cadena pesada HCo7 y HCo12 y era hemocigota para cada transgén. Todas estas cepas se denominan en el presente documento ratones HuMab.

Inmunizaciones de HuMab

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos a IFN- γ , se inmunizaron ratones HuMab con IFN- γ humano recombinante purificado derivado de células de *E. coli* o CHO como antígeno. Se describen esquemas de inmunización generales para ratones HuMab en Lonberg *et al.* (1994, Nature 368:856-859; Fishwild *et al.*, citado anteriormente, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 98/24884). Los ratones tenían 6-16 semanas de edad en la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (25-100 μ g) de antígeno IFN- γ (por ejemplo, purificada a partir de células transfectadas de *E. coli* o CHO que expresan IFN- γ) para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía subcutánea (s.c.).

Se lograron inmunizaciones de ratones transgénicos HuMab usando el antígeno en adyuvante completo de Freund y dos inyecciones, seguido de inmunización i.p. durante 2-4 semanas (hasta un total de 9 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno (IFN- γ humano producido en células o bien de *E. coli* o bien CHO). Se inmunizaron un total de 91 ratones de las cepas HCo7, HCo12 y HCo7+HCo12 con IFN- γ . Se controló la respuesta inmunitaria mediante extracciones de sangre retroorbital.

Para seleccionar ratones HuMab que producen anticuerpos que se unen a IFN- γ , se sometieron a prueba sueros de ratones inmunizados mediante ELISA tal como se describe por Fishwild *et al.* citado anteriormente. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación con IFN- γ recombinante purificado a partir de células CHO o de *E. coli* a 1-2 μ l/ml en PBS y se incubaron 50 μ l/pocillo a 4°C durante la noche, entonces se bloquearon con 200 μ l/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de IFN- γ de ratones inmunizados a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween y entonces se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fe de IgG de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween y se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fe de IgG de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se revelaron las placas con sustrato ABTS (Sigma Chemical Co., San Luis, MO, n.º de catálogo A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron de manera espectrofotométrica mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a longitudes de onda de desde 415-495 nm. Se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IFN- γ para producir anticuerpos monoclonales tal como se describe a continuación.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos frente a IFN- γ

Se prepararon ratones para la producción de anticuerpos monoclonales mediante inmunización de refuerzo con antígeno por vía intravenosa 2 días antes del sacrificio, y se extirparon los bazo después de eso. Se aislaron los esplenocitos de ratón de los ratones HuMab y se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón usando protocolos habituales. Normalmente, se realizaron 10-20 fusiones para cada antígeno.

ES 2 370 473 T3

Brevemente, se fusionaron suspensiones celulares únicas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a una cuarta parte del número de células de mieloma de ratón que no secretan P3X63-Ag8.653 (ATCC, n.º de acceso CRL 1580) con PEG al 50% (Sigma). Se cultivaron en placa las células a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente una incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía suero de bovino fetal al 10%, medio condicionado P388D1- al 10% (ATCC, n.º de acceso CRL TIB-63), factor de clonación de hibridomas ORIGEN[®] al 3-5% (IGEN), un complemento de medio de crecimiento de hibridomas purificado parcialmente derivado del medio usado para cultivar una línea celular similar a macrófago murina, en DMEM (Mediatech, n.º de catálogo CRL 10013, con alto contenido en glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y 1x HAT (Sigma, n.º de catálogo CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, se cultivaron las células en el medio en que el HAT se reemplazó por HT.

Se examinaron los hibridomas resultantes para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se examinaron los pocillos individuales mediante ELISA (descrito anteriormente) para anticuerpos IgG monoclonales anti-IFN- γ humano. Una vez que se produjo el crecimiento extenso de hibridomas, se monitorizó el medio, habitualmente después de 10-14 días. Se volvieron a sembrar en placa los hibridomas que secretaban anticuerpos, se examinaron de nuevo y, si todavía eran positivos para IgG humana, se subclonaron anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ al menos dos veces mediante dilución limitante. Se cultivaron entonces los subclones estables *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para purificación y caracterización.

Selección de anticuerpos monoclonales humanos que se unen a IFN- γ

Se usó un ensayo ELISA tal como se describió anteriormente para examinar hibridomas que mostraron reactividad positiva con el inmunógeno de IFN- γ . Se subclonaron y se caracterizaron adicionalmente, los hibridomas que secretaron un anticuerpo monoclonal que se unió con alta avidéz a IFN- γ . Se escogió un clon de cada hibridoma, que conservaba la reactividad de las células progenitoras (tal como se determinó mediante ELISA), para preparar un banco de células de 5-10 viales almacenados en nitrógeno líquido.

Se realizó un ELISA específico de isotipo para determinar el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos tal como se da a conocer en el presente documento. En estos experimentos, se recubrieron pocillos de placa de microtitulación con 50 μ l/pocillo de una disolución de 1 μ g/ml de cadena ligera kappa anti-humana de ratón en PBS y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de bloquear con suero de pollo al 5%, se hicieron reaccionar las placas con sobrenadante de cada anticuerpo monoclonal sometido a prueba y un control de isotipo purificado. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Se hicieron reaccionar entonces los pocillos con antisueros policlonales anti-humanos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano específicos de o bien IgG1 o bien IgG3 humana, y se revelaron y analizaron las placas tal como se describió anteriormente.

Se sometieron a prueba además anticuerpos monoclonales purificados a partir de los sobrenadantes de hibridoma que mostraron unión significativa a IFN- γ tal como se detectó mediante ELISA para determinar la actividad biológica usando una variedad de bioensayos tal como se describe a continuación. Se designaron los anticuerpos seleccionados como 1119, 1121, 1118*, 1121* y 1118.

Ejemplo 3

Clonación de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo anti-IFN- γ

Se usaron los hibridomas que expresaban anticuerpos monoclonales de unión a IFN- γ 1119, 1121, 1118*, 1121* y 1118 identificados en el ejemplo 2 anterior como fuentes para aislar ARN total usando el reactivo TRIzol[®] (Invitrogen), una disolución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina adecuada para aislar ARN total, ADN y proteína. Se sintetizó la primera cadena de ADNc usando un cebador al azar con un adaptador de extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ID NO: 23) y se realizó un ensayo preparativo de 5'-RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) usando el kit GENERACER[™] (Invitrogen), un kit para amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) con eficiencia mejorada, según las instrucciones del fabricante. Para preparar ADNc que codifica para la cadena ligera completa, el cebador sentido era el cebador anidado GENERACER, y el cebador antisentido era 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO: 24). Se diseñó el cebador antisentido para reconocer una región conservada de la secuencia de ADNc que se encuentra en la región no traducida en 3' de las cadenas kappa humanas. Para preparar ADNc que codifica para la región variable de las cadenas pesadas, el cebador sentido era el cebador anidado GENERACER[™] y el cebador antisentido era 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO: 25), que se diseñó para reconocer una región conservada en la secuencia codificante en la región Fe de cadenas de IgG humanas. Se clonaron los productos de RACE en pCR4-TOPO (Invitrogen), y se determinaron las secuencias. Se usaron secuencias de consenso para diseñar cebadores para amplificación por PCR de cadenas de anticuerpo de longitud completa.

Para preparar ADNc que codifica para cadena ligera kappa anti-IFN- γ , el cebador de PCR en 5' codificaba para el extremo amino-terminal de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción *Xba*I, y una secuencia Kozak optimizada (5'-ACA ACA AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA AAC CCC AGC TCA GCT TCT CTT-3'; SEQ ID NO: 26). El cebador en 3' codificaba para el extremo carboxilo-terminal y el codón de terminación, así como un sitio

ES 2 370 473 T3

de restricción *SalI* (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT-3'; SEQ ID NO: 27). Se purificó el fragmento del producto de PCR resultante, se digirió con *XbaI* y *SalI*, y entonces se aisló con gel y ligó en el vector de expresión de mamífero pDSR α 19 (véase la publicación de solicitud internacional, WO 90/14363).

5 Para preparar ADNc que codifica para cadena pesada anti-IFN- γ , el cebador de PCR en 5' codificaba para el extremo amino-terminal de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción *XbaI*, y una secuencia Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGG GTC AAC CGC CAT CCT CG-3'; SEQ ID NO: 28). El cebador en 3' codificaba para el extremo carboxilo de la región variable, incluyendo un sitio *BsmBI* de cadena sentido que se produce de manera natural (5'-CTT GGT GGA GGC ACT AGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC-3';
10 SEQ ID NO: 29). Se purificó el producto resultante, se digirió con *XbaI* y *BsmBI*, se aisló con gel y ligó en el vector pDSR α 19 que contenía la región constante de IgG1 humana.

Ejemplo 4

15 *Expresión de anticuerpos anti-IFN- γ en células de ovario de hámster chino (CHO)*

Se logró la expresión estable del AcM anti-IFN- γ 1119 mediante cotransfección de plásmidos de cadena pesada de 1119/pDSR α 19 y cadena kappa de 1119/pDSR α 19 en células de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas libres de suero, deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR-), usando un método de fosfato de calcio. Se seleccionaron células transfectadas en medio que contenía suero dializado pero que no contenía hipoxantina-timidina para asegurar el crecimiento de células que expresan la enzima DHFR. Se examinaron los clones transfectados usando ensayos tales como ELISA con el fin de detectar la expresión de AcM anti-IFN- γ 1119 en el medio condicionado. Se sometieron las líneas celulares que expresaban 1119a amplificación con metotrexato. Se seleccionaron los clones de mayor expresión
25 tras la amplificación para la clonación de células individuales y la creación de bancos de células.

Puede generarse cualquier anticuerpo anti-IFN- γ recombinante de la invención en células de ovario de hámster chino deficientes en DHFR usando el mismo protocolo tal como se describió anteriormente para el AcM 1119. Se clonan las secuencias de ADN que codifican para la cadena ligera o cadena pesada completa de cada anticuerpo anti-IFN- γ de la invención en vectores de expresión. Se cotransfectan las células CHO deficientes en DHFR con un vector de expresión que puede expresar una cadena pesada completa y un vector de expresión que expresa la cadena ligera completa del anticuerpo anti-IFN- γ apropiado. Por ejemplo, para generar el anticuerpo 1118, se cotransfectaron células con un vector que puede expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 y un vector que puede expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20. Para generar el anticuerpo 1121, se cotransfectaron células con un vector que puede expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21 y un vector que puede expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22. Para generar el anticuerpo 1118*, se cotransfectaron células con un vector que puede expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 y un vector que puede expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20. Para generar el anticuerpo 1121*, se cotransfectaron células con un vector que puede expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21 y un vector que puede expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33. La tabla 3 resume las cadenas ligeras completas y pesadas completas para los diversos anticuerpos IFN- γ .
45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 370 473 T3

TABLA 3

Anticuerpo	Región variable de cadena pesada + Región constante de cadena pesada	Cadena pesada completa
1119	SEQ ID NO: 6 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 17
1118	SEQ ID NO: 10 + SEQ IDNO: 2	SEQ ID NO: 19
1121	SEQ ID NO 14 + SEQ ID NO 2	SEQ ID NO: 21
1121*	SEQ ID NO 14 + SEQ ID NO 2	SEQ ID NO: 21
1118*	SEQ ID NO: 30 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 32
Anticuerpo	Región variable de cadena ligera + Región constante de cadena ligera	Cadena ligera completa
1119	SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 18
1118	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 20
1121	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 22
1121*	SEQ ID NO 31 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 33
Anticuerpo	Región variable de cadena pesada + Región constante de cadena pesada	Cadena pesada completa
1118*	SEQ ID NO 12 + SEQ ID NO 4	SEQ ID NO 20

Ejemplo 5

Producción del anticuerpo anti-IFN- γ

Se produjo el anticuerpo 1119 mediante la expresión en una línea clonal de células CHO que lo expresaba. Para la serie de producción, se descongelaron células de un único vial en los medios de cultivo celular libres de suero. Se cultivaron las células inicialmente en un matraz de agitación de 250 ml, entonces en matraces giratorios y finalmente en reactores de acero inoxidable de escala creciente hasta un biorreactor de 2000 l. Se llevó a cabo la producción en un biorreactor de 2000 l usando un cultivo semicontinuo, en el que se añade una alimentación de nutrientes que contiene componentes de medios concentrados para mantener el crecimiento celular y viabilidad del cultivo. La producción duró aproximadamente dos semanas, tiempo durante el cual el anticuerpo 1119 se produjo de manera constitutiva por las células y se secretó en el medio de cultivo celular.

Se controló el reactor de producción a un pH, temperatura y nivel de oxígeno disuelto predeterminados. Se controló el pH mediante adición de carbonato de sodio y gas de dióxido de carbono. Se controló el oxígeno disuelto mediante flujos de gas de oxígeno, nitrógeno y aire.

Al final de la producción, se alimentó el caldo celular a una centrífuga de discos apilados, y se separó el sobrenadante de cultivo de las células. Se clarifica adicionalmente el concentrado a través de un filtro de profundidad seguido de un filtro de 0,2 μm . Se concentraron entonces los medios condicionados clarificados mediante ultrafiltración de flujo tangencial. Se concentraron los medios condicionados de 15 a 30 veces. Se procesó entonces el medio condicionado concentrado resultante para purificar el anticuerpo que contiene, pero puede congelarse para purificación en una fecha posterior. Puede producirse cualquiera de los otros anticuerpos descritos en el presente documento de manera similar.

Ejemplo 6

Caracterización de la actividad de anticuerpos anti-IFN- γ

5 Puesto que IFN- γ tiene un gran número de efectos biológicos, se usaron varios bioensayos diferentes para comparar la potencia de diversos anticuerpos IFN- γ . Se usó el ensayo de A549 que se describe a continuación para la selección primaria con candidatos seleccionados para análisis adicional basándose en su rendimiento en el ensayo. Los candidatos seleccionados incluyeron los anticuerpos 1119, 1118 y 1121.

10 *Bioensayo de A549*

Una de las propiedades establecidas de IFN- γ es su efecto antiproliferativo sobre una variedad de poblaciones celulares. Véase, por ejemplo, Aune y Pogue, 1989, J. Clin. Invest. 84:863-75. Se ha usado la línea celular de pulmón humano A549 frecuentemente en publicaciones que describen la bioactividad de IFN- γ . Véanse por ejemplo Aune y Pogue, citado anteriormente; Hill *et al.*, 1993, Immunology 79:236-40. En general, se somete a prueba la actividad de un inhibidor a una concentración de una sustancia estimulante que se encuentre dentro de una parte de la curva de dosis-respuesta en la que un cambio pequeño en la dosis dará como resultado un cambio en la respuesta. Un experto en la técnica se dará cuenta de que si se usa una dosis excesiva de la sustancia estimulante, puede requerirse una dosis muy grande de un inhibidor para observar un cambio en la respuesta. Concentraciones usadas comúnmente para una sustancia estimulante son la CE₈₀ y la CE₉₀ (las concentraciones a las que se logra el 80% o el 90%, respectivamente, de la respuesta máxima).

Se generó una curva de dosis-respuesta de IFN- γ para determinar la CE₉₀ para la línea celular de carcinoma epitelial de pulmón A549 (~30 pM). En experimentos posteriores, se mezclaron diferentes concentraciones de anticuerpos purificados con una dosis fija de IFN- γ (30 pM), y se determinó la habilidad de los anticuerpos para inhibir la actividad biológica del efecto antiproliferativo de IFN- γ . Se realizó el ensayo durante 5 días, y se midió la proliferación mediante la determinación de la fluorescencia generada por la reducción de ALAMARBLUE™ (AccuMed International, Inc., Chicago, Illinois), un colorante usado para indicar el crecimiento celular, mediante células metabólicamente activas, es decir, en proliferación. Véanse por ejemplo, de Fries y Mitsuhashi, 1995, J. Clin. Lab. Analysis 9 (2):89-95; Ahmed *et al.*, 1994, J. Immunol. Methods 170 (2):211-24.

Tal como se muestra en la figura 9, el anticuerpo 1119 era el anticuerpo más potente con una CI₅₀ (concentración a la que se logra una inhibición del 50% del efecto de IFN- γ) de 14 pM, seguido de 1121 (46 pM) y 1118 (97 pM).

35 *Bioensayo de HLA DR*

Otra propiedad establecida de IFN- γ es su habilidad para regular por incremento la expresión de genes de CMH de clase I y clase II en una variedad de tipos de células. Esta actividad puede ser particularmente relevante para la nefritis lúpica (Yokoyama *et al.*, 1992, Kidney Int. 42:755-63). Se ha usado la línea celular monocítica humana THP-1 frecuentemente en publicaciones que describen esta bioactividad de IFN- γ . Se generó una curva de dosis-respuesta IFN- γ para determinar la CE₈₀ para la línea celular particular THP-1 usada en este experimento (~21 pM). En experimentos posteriores, se mezclaron diferentes concentraciones de anticuerpos purificados con una dosis fija de IFN- γ (21 pM) y se determinó la capacidad de los anticuerpos para neutralizar o inhibir la regulación por incremento inducida por IFN- γ de la expresión de HLA DR en la superficie celular. Se realizó el ensayo durante 24 horas, y el criterio de valoración medido era la intensidad de fluorescencia media tal como se determinó mediante análisis FACS para detectar la unión de un anticuerpo anti-HLA DR marcado con FITC a las células.

50 Tal como se muestra en la figura 10, el anticuerpo 1119 era el anticuerpo más potente con una CI₅₀ de 14 pM, seguido de 1121 (60 pM) y 1118 (86 pM).

55 *Bioensayo de sanare completa*

Se desarrolló un ensayo de sangre completa humana basándose en las observaciones publicadas de que IFN- γ regula por incremento la producción de la quimiocina IP-10 en varias líneas celulares diferentes. Esta actividad puede ser particularmente relevante para la nefritis lúpica (Narumi *et al.*, 2000, Cytokine 12:1561-1565). Se sometió a prueba la sangre completa de varios donantes humanos normales para determinar la capacidad de IFN- γ para aumentar la producción de IP-10. Se generó una curva de dosis-respuesta de IFN- γ para determinar la CE₅₀ para donantes individuales. Como se esperaba, se observó cierta variación entre donantes. En general, se usaron donantes que parecieron presentar de manera reproducible una CE₅₀ de 50-100 pM. Se mezcló la sangre completa con una concentración fija de IFN- γ y diferentes concentraciones de anticuerpos, se incubaron durante 18,5 horas y entonces se determinaron los niveles de IP-10 mediante ELISA. Se muestran en la figura 11 los resultados representativos de un ensayo de sangre completa para dos donantes diferentes. Las CI₅₀ de estos dos donantes fueron de 17 y 14 pM. Hasta el momento, se ha identificado un donante con niveles de IP-10 elevados espontáneamente en el ensayo de sangre completa sin necesidad de adición de IFN- γ exógeno. Los anticuerpos anti-IFN- γ pudieron bloquear esta producción espontánea de IP-10 se supone que mediante el bloqueo del IFN- γ producido de manera endógena.

Ensayos bioquímicos

Se midieron cinéticas de unión para varios de los anticuerpos frente a IFN- γ mediante análisis BIAcore. Resultados iniciales sugirieron que los anticuerpos tenían constantes de disociación que se aproximaban a las limitaciones para las mediciones fiables en el BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB Corporation, Uppsala, Suecia), un aparato que usa resonancia de plasmón superficial para medir la unión entre moléculas. Por consiguiente, se desarrolló y usó un ensayo de equilibrio-unión. Se incubó una cantidad fija de anticuerpo con diversas concentraciones de IFN- γ durante más de 5 horas con el fin de alcanzar el equilibrio y entonces se puso en contacto con perlas acopladas de IFN- γ durante un tiempo muy breve, y se midió la cantidad de anticuerpo libre que se unió a las perlas en una máquina KINEXA™ (Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID), un instrumento de inmunoensayo basado en fluorescencia. La constante de disociación en equilibrio más baja obtenida, -24 pM, fue con el anticuerpo 1119.

Ejemplo 7

Reactividad cruzada de especies

Se sometieron a prueba los anticuerpos descritos anteriormente para determinar su capacidad para neutralizar o inhibir proteínas IFN- γ recombinante de varias especies diferentes. Se adquirió comercialmente la proteína IFN- γ de ratón, mientras que se clonaron las proteínas IFN- γ humanas, de mono macaco y de chimpancé y expresaron en sistemas de expresión de mamífero convencionales tales como células humanas 293. Las proteínas IFN- γ humanas, de macaco y chimpancé eran todas activas en el ensayo de A549 descrito anteriormente mientras que la proteína de ratón no era activa en este ensayo. La proteína de ratón era activa en un ensayo basado en líneas celulares de RAW 264.7, que era esencialmente idéntico al ensayo de A549 descrito previamente excepto por la sustitución de la línea celular de ratón. RAW 264.7 es una línea celular de macrófagos monocíticos de ratón y puede obtenerse de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo. Tal como se muestra en la tabla 4, los tres anticuerpos pudieron neutralizar IFN- γ de seres humanos y chimpancés, mientras que ninguno de los tres pudo neutralizar o inhibir la actividad biológica de IFN- γ ni de macaco ni de ratón.

TABLA 4

Anticuerpo	Humano	Chimp.	Macaco	Ratón
1118	Sí	Sí	No	No
1119	Sí	Sí	No	No
1121	Sí	Sí	No	No

Ejemplo 8

Identificación de un epítipo para anticuerpos anti-IFN- γ

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de IFN- γ humano y de macaco maduros indicó que había nueve diferencias de aminoácido entre ellos en las posiciones 19, 20, 31, 34, 65, 77, 103, 110 y 126 en la secuencia de IFN- γ humano. Las secuencias de IFN- γ humano y de chimpancé se dan a conocer en Thakur y Landolfi (1999), Molecular Immunology 36:1107-15, la secuencia de IFN- γ de macaco se da a conocer en Tatsumi y Sata (1997), Int. Arch. Allergy Immunol. 114 (3):229-36; y la secuencia de IFN- γ murino se da a conocer en, por ejemplo, el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) n.º de registro NP_032363. Se usó mutagénesis dirigida utilizando un kit disponible comercialmente para sustituir individualmente cada uno de los aminoácidos humanos divergentes en el IFN- γ humano por el aminoácido correspondiente de la proteína de macaco. Cada IFN- γ sustituido se denominó "huIFN- γ " seguido por el símbolo para el aminoácido usado para sustituir el aminoácido presente en la secuencia de IFN- γ humano y la posición en la secuencia de IFN- γ humano maduro en la que se produce la sustitución. Por ejemplo, "huIFN- γ D19" representa una versión de IFN- γ idéntica a IFN- γ humano excepto en la posición 19, en la que un ácido aspártico sustituye la histidina que normalmente ocupa esta posición. Se realizaron experimentos similares partiendo de IFN- γ de macaco y sustituyendo cada aminoácido divergente por el aminoácido presente en IFN- γ humano. Por ejemplo, "macaIFN- γ L103" representa una versión de IFN- γ idéntica a IFN- γ de macaco excepto en la posición 103, en la que una leucina sustituye a la serina que normalmente ocupa esta posición. Véanse las tablas 5 y 6. Estas proteínas mutantes se expresaron en un sistema de expresión de mamífero convencional tal como las células 293 humanas. Todas las proteínas de IFN- γ mutantes conservaron actividad tal como se determinó en el ensayo de A549. Se sometió a prueba el anticuerpo 1119 para determinar su capacidad para neutralizar o inhibir la actividad biológica de las diversas proteínas de IFN- γ mutantes, tal como se determinó usando un bioensayo de A549. Se determinó la capacidad del anticuerpo 1119 para neutralizar o inhibir la actividad antiproliferativa de IFN- γ

ES 2 370 473 T3

humano midiendo la fluorescencia tal como se describió anteriormente, y esto se usó como nivel inicial para comparar la capacidad del anticuerpo 1119 para neutralizar la actividad de cada una de las formas variantes de IFN- γ . Para los constructos que partieron de IFN- γ humano, se midió la inhibición de la actividad de IFN- γ como un porcentaje, en el que el nivel máximo de fluorescencia observada en presencia del IFN- γ humano y el anticuerpo 1119 (debido a la reducción de ALAMARBLUE™ por células en proliferación) se fijó en el 100%, y se compararon con esto los niveles máximos medidos en presencia de cada una de las formas alteradas de IFN- γ más el anticuerpo 1119. Alternativamente, para los constructos que partieron de IFN- γ de macaco, se puntuó cualitativamente la inhibición basándose en la fluorescencia observada.

Tal como se resume en la tabla 5, el anticuerpo 1119 pudo neutralizar o inhibir la actividad biológica de IFN- γ humano y todos los mutantes de sustitución de IFN- γ humano excepto por huIFN- γ D19 y huIFN- γ P20. Como en el ejemplo anterior, la proteína de IFN- γ de macaco tampoco se inhibió mediante el anticuerpo 1119. Este análisis indica que los residuos 19 y 20 son particularmente importantes para la interacción entre el anticuerpo 1119 e IFN- γ y puede servir como puntos de contacto entre el anticuerpo 1119 e IFN- γ humano.

TABLA 5

IFN- γ	% Neutralización por 1119
IFN- γ humano	100
IFN- γ de macaco	0
huIFN- γ D19	0
huIFN- γ P20	0
huIFN- γ D31	103
huIFN- γ R34	109
huIFN- γ R65	109
huIFN- γ I77	108
huIFN- γ S103	102
huIFN- γ V110	103
huIFN- γ I126	109

La tabla 6 muestra que una versión alterada de IFN- γ de macaco que comprende sustituciones que hacen que la secuencia de IFN- γ de macaco coincida con la secuencia humana en las posiciones 19 y 20 no se neutralizó por el anticuerpo 1119. Sin embargo, las versiones de IFN- γ de macaco que tienen sustituciones de la secuencia humana en las posiciones 19, 20 y 65, o 19, 20 y 103 se neutralizaron por el anticuerpo 1119, como lo fueron las versiones que contienen sustituciones además de cualquiera de éstas.

TABLA 6

Constructo	Neutralización por 1119
IFN- γ humano	sí
IFN- γ de macaco	no
IFN- γ H19/S20 de macaco	no
IFN- γ S65 de macaco	no
IFN- γ L103 de macaco	no
IFN- γ S65/L103 de macaco	no
IFN- γ H19/S20/S65 de macaco	sí
IFN- γ H19/S20/L103 de macaco	sí
IFN- γ H19/S20/L103/I110 de macaco	sí
IFN- γ H19/S20/S65/L103/I110 de macaco	sí

Ejemplo 9

Actividad biológica de anticuerpo anti-IFN- γ con la administración a chimpancés

Se administró el anticuerpo 1119a dos chimpancés a una dosis de 20 mg/kg cada semana durante tres semanas. Se extrajo sangre de los chimpancés o bien dos semanas (-2) o bien una semana (-1) antes de la administración de anticuerpo, y se extrajo sangre adicionalmente a los 2, 8, 15, 29 y 36 días tras la administración de la primera dosis de anticuerpo. Se realizó un ensayo de sangre completa de chimpancé con la sangre extraída usando esencialmente el mismo método usado en el ensayo de sangre completa humana descrito en el ejemplo 6, siendo la distinción clave que el anticuerpo no se añadió a la sangre completa de manera exógena sino que se administró previamente *in vivo* a los chimpancés. Se añadió IFN- γ a la sangre a diversas concentraciones (0,01 ng/ml, 3,9 ng/ml o 1 μ g/ml), se incubó la sangre a 37°C durante 20-24 horas, y luego se midió la producción de IP-10 mediante ELISA basado en perlas.

Tal como puede observarse en las figuras 14 y 15, la sangre extraída a los animales antes de la dosificación del anticuerpo respondió a IFN- γ con un aumento dependiente de la concentración en la producción de IP-10. En contraposición, la sangre extraída tras la administración del anticuerpo no respondió a ninguna de las concentraciones de IFN- γ sometidas a prueba con un aumento en la producción de IP-10. Estos datos indican que el anticuerpo conservó la capacidad para neutralizar IFN- γ , incluso tras la administración *in vivo*. Además, la cantidad de IFN- γ añadida a estos cultivos superó enormemente los niveles endógenos de IFN- γ en los chimpancés, lo que sugiere que el anticuerpo administrado podría neutralizar el IFN- γ endógeno *in vivo*.

Debe entenderse que la descripción anterior pone énfasis en determinadas realizaciones específicas de la invención y que todas las modificaciones o alternativas equivalentes a las mismas se encuentran dentro del alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 370 473 T3

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo completamente humano aislado que comprende

una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;

una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37;

una CDR1 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39;

una CDR2 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 41; y

una CDR3 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 43,

en el que el anticuerpo se une específicamente a IFN- γ humano.

2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende

una región variable de cadena pesada idéntica en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 6 y/o la SEQ ID NO: 14 y

una región variable de cadena ligera idéntica en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 16.

3. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que

la región variable de cadena pesada es idéntica en al menos el 95% a la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 6 y/o la SEQ ID NO: 14 y

la región variable de cadena ligera es idéntica en al menos el 95% a la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 16.

4. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12.

5. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

6. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16.

7. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20.

8. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

9. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.

10. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que

la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; y

la CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

11. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que

la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y

ES 2 370 473 T3

la CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

5 12. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que

la CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; y

la CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

10 13. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo el anticuerpo una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región V_H , una región C_{H1} , una región C_{H2} y una región C_{H3} y en el que la cadena ligera comprende una región V_L y una región C_L .

15 14. Anticuerpo según la reivindicación 13, siendo el anticuerpo un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4.

15. Anticuerpo según la reivindicación 14, siendo el anticuerpo un anticuerpo IgG1.

20 16. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, siendo el anticuerpo un anticuerpo de cadena sencilla.

17. Polinucleótido aislado que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

25 18. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 17.

19. Célula huésped que contiene el polinucleótido según la reivindicación 17.

20. Célula huésped según la reivindicación 19, siendo la célula huésped una célula de mamífero.

30 21. Célula huésped según la reivindicación 20, siendo la célula huésped una célula CHO.

22. Método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21.

35 23. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

Región constante de cadena pesada de IgG1

gcctccacca	agggcccatc	ggctctcccc	ctggcacctt	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagecg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	120
tggaactcag	gcgccttgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cggtgtctct	acagtctctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttgtg	acaaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagtct	tctcttcccc	ccccaaaacc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccct	420
gaggtcaca	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggagc	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacacc	tgccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaa	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggctcctt	cttctctat	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	960
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa				990

FIG. 1B

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNPKPS	NTKVDKKEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVDNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPO	VYTLPPSRDE	240
LTIKQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSGGSFFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVPSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPCK				330

FIG. 2A

Región constante de cadena kappa

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcate	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctgttggtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagagge	caaagtacag	120
tggaagggtg	ataacgcct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	acctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

FIG. 2B

RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	60
SKDSTYSLSS	TLTLSKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC		107

FIG. 3A

Región variable de cadena pesada de 1119

gaggtgcagc	tggtacagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	caactctacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagtt	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtecatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgg	ttcggggagc	300
tacttttact	tcgatctctg	gggccgtggc	accctggtca	ccgtctctag	t	351

FIG. 3B

EVQLVQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSOYNFT	SYWIGMVRQM	PKQGLELMGI	IYPGDSDRY	60
SPSPQGGVTI	SADKSISTAY	LQWSSLKASD	TAMYYCOSGS	YFYFDLNGRG	TLVTVSS	117

FIG. 4A

Región variable de cadena kappa de 1119

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctectgca	ggccagtc	gagtgttagc	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatatat	ggtgcateca	gcagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgt	ttactgtcag	cggtctggtg	gctcatcatt	cactttcggc	300
cctgggacca	aagtggatat	caaa				324

FIG. 4B

EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSCT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	RSGGSSPTFG	PGTKVDIK		108

FIG. 5A

Región variable de cadena pesada de 1118

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgg	ttcggggagc	300
tactggtact	tcgatctctg	gggccgtggc	accctggcca	ccgtctctag	t	351

FIG. 5B

EVQLVQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSPT	SYWIGWVRQM	PGKGLEWMGI	IYPGDSDFRY	60
SPSPQQQVTI	SADKSISTAY	LQWSSLKASD	TAMYYCGSGS	YWYFDLRGRG	TLVTVSS	117

FIG. 5C

Región variable de cadena pesada de 1118*

EVQLVQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSPT	SYWIGWVRQM	PGKGLEWMGI	IYPGDSDFRY	60
SPSPQQQVTI	SADKSISTAY	LQWSSLKASD	TAMYYCGSGS	YWYFDLRGRG	TLVTVSS	117

FIG. 5D

Región variable de cadena pesada de 1118*

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgg	ttcggggagc	300
tactggtact	tcgatctccg	gggccgtggc	accctggcca	ccgtctctag	t	351

FIG. 6A

Región variable de cadena kappa de 1118

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtea	gagtgttagc	agcagctcct	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatatat	ggtgcatcca	gcagggccac	tggcatcca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gactteactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgta	ttactgtcag	cggtctggtg	gctcatcatt	cactttcggc	300
cctgggacca	aagtggatat	caa				324

FIG. 6B

EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSSLAWYQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYVCQ	RSGGSSFTFG	PGTKVDIK		108

FIG. 7A

Región variable de cadena pesada de 1121

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	caactttacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagtt	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agccccctct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgg	ttcggggagc	300
tactggtact	tcgatctctg	gggccgtggc	accctggtca	ccgtctctag	t	351

FIG. 7B

EVQLVQSGAE	VKKPGESLKI	SKKSGYNFT	SYWIGWVRQM	PGKGLELMGI	IYPGDS TRY	60
SPSFQGV TI	SADKSISTAY	LQWSSLXASD	TAMY YCGSGS	YWYFDLWGRG	TLVTVSS	117

FIG. 8A

Región variable de cadena kappa de 1121

gaaattggt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctectgca	gggccagtca	gagtgttagc	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatatat	ggtgcatcca	gcagggccac	tgcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgta	ttactgtcag	cggtctggtg	gctcatcatt	cactttcggc	300
cctgggacca	aagtggatat	caaa				324

FIG. 8B

EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQOK	PQQAPRLLIY	GASBRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DPTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	RSGGSSFTFG	PGTKVDIK		108

FIG. 8C

Región variable de cadena kappa de 1121*

EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSI	SSYLAWYQOK	PGQTPRLLIY	GVSSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DPTLTITRLE	PEDFAVYYCQ	OYGNSPMYTP	QOTKLEIK		109

FIG. 8D

Región variable de cadena kappa de 1121*

gaaattggt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctectgca	gggccagtca	gagtattatc	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccaga	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgatcca	gcagggccac	tgcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcac	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgta	ttactgtcag	cagtatggtg	actcatttat	gtacactttt	300
ggccagggga	ccaagctgga	gatcaaa				327

Fig. 9

Ensayo de A549

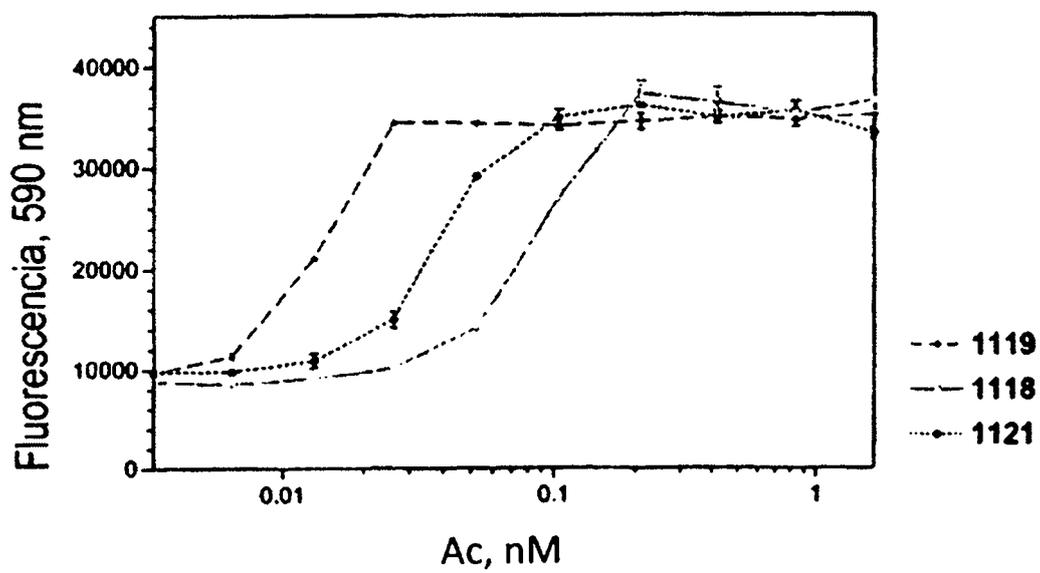


Fig. 10

Ensayo de THP1

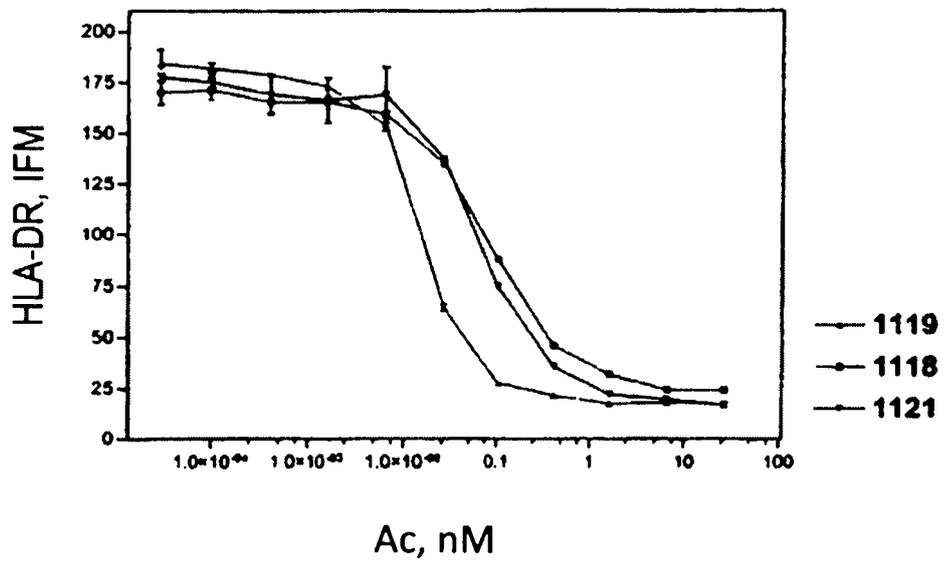


Fig. 11

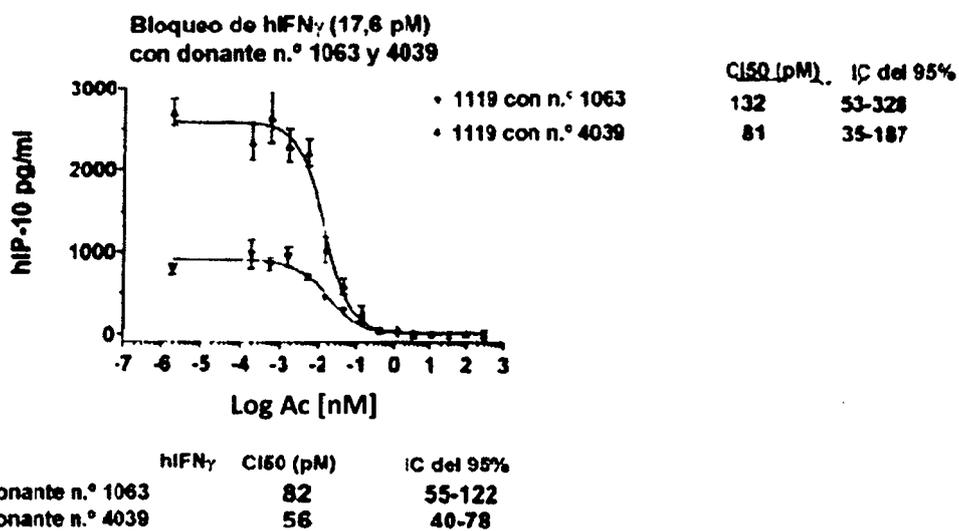


FIG. 12

CDR1

1119 MGSTAILALL LAVLQGVCAE VQLVQSGAEV KKPGESLKIS CKSGY¹¹¹⁹NFTS YWIGWVRQMP 60
 1118 MGSTAILALL LAVLQGVCAE VQLVQSGAEV KKPGESLKIS CKSGY¹¹¹⁸SFTS YWIGWVRQMP 60
 1118* MGSTAILALL LAVLQGVCAE VQLVQSGAEV KKPGESLKIS CKSGY¹¹¹⁸BFTS YWIGWVRQMP 60
 1121 MGSTAILALL LAVLQGVCAE VQLVQSGAEV KKPGESLKIS CKSGY¹¹²¹NFTS YWIGWVRQMP 60

CDR2

1119 GKGLE¹¹¹⁹MGII YPGDSDTRY¹¹¹⁹ PSFQGQVTIS ADKSISTAYL QWSSLKASDT AMYCGSGSY 120
 1118 GKGLE¹¹¹⁸MGII YPGDSDTRY¹¹¹⁸ PSFQGQVTIS ADKSISTAYL QWSSLKASDT AMYCGSGSY 120
 1118* GKGLE¹¹¹⁸MGII YPGDSDTRY¹¹¹⁸ PSFQGQVTIS ADKSISTAYL QWSSLKASDT AMYCGSGSY 120
 1121 GKGLE¹¹²¹MGII YPGDSDTRY¹¹²¹ PSFQGQVTIS ADKSISTAYL QWSSLKASDT AMYCGSGSY 120

CDR3

1119 WYFDL¹¹¹⁹MGRT LVTVSSASTK GPASVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYP EPVTVSWNSG 180
 1118 WYFDL¹¹¹⁸MGRT LVTVSSASTK GPASVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYP EPVTVSWNSG 180
 1118* WYFDL¹¹¹⁸MGRT LVTVSSASTK GPASVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYP EPVTVSWNSG 180
 1121 WYFDL¹¹²¹MGRT LVTVSSASTK GPASVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYP EPVTVSWNSG 180

FIG. 13

	CDR1		
1119	METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS <u>SSYLA</u> WYQQK	60	
1118	METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS <u>SSYLA</u> WYQQK	60	
1121	METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS <u>SSYLA</u> WYQQK	60	
1121*	METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVI <u>SSYLA</u> WYQQK	60	
	CDR2		
1119	PGQAPRLLIY <u>QAS</u> SRATGIP DRFSGSGGT DFTLTISRLE <u>PEDFAVY</u> YCO <u>RSQ-<u>GSST</u></u> TFG	120	
1118	PGQAPRLLIY <u>QAS</u> SRATGIP DRFSGSGGT DFTLTISRLE <u>PEDFAVY</u> YCO <u>RSQ-<u>GSST</u></u> TFG	120	
1121	PGQAPRLLIY <u>QAS</u> SRATGIP DRFSGSGGT DFTLTISRLE <u>PEDFAVY</u> YCO <u>RSQ-<u>GSST</u></u> TFG	120	
1121*	PGQAPRLLIY <u>QVSS</u> SRATGIP DRFSGSGGT DFTLTISRLE <u>PEDFAVY</u> YCO <u>QXGMBYNY</u> TFG	121	
	CDR3		
1119	<u>PGTKVD</u> IKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNE YPREAKVQWK VDNALQSGNS	180	
1118	<u>PGTKVD</u> IKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNE YPREAKVQWK VDNALQSGNS	180	
1121	<u>PGTKVD</u> IKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNE YPREAKVQWK VDNALQSGNS	180	
1121*	<u>QGTKLE</u> IKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNE YPREAKVQWK VDNALQSGNS	181	
1119	QESVT	185	
1118	QESVT	185	
1121	QESVT	185	
1121*	QESVT	186	

Figura 14

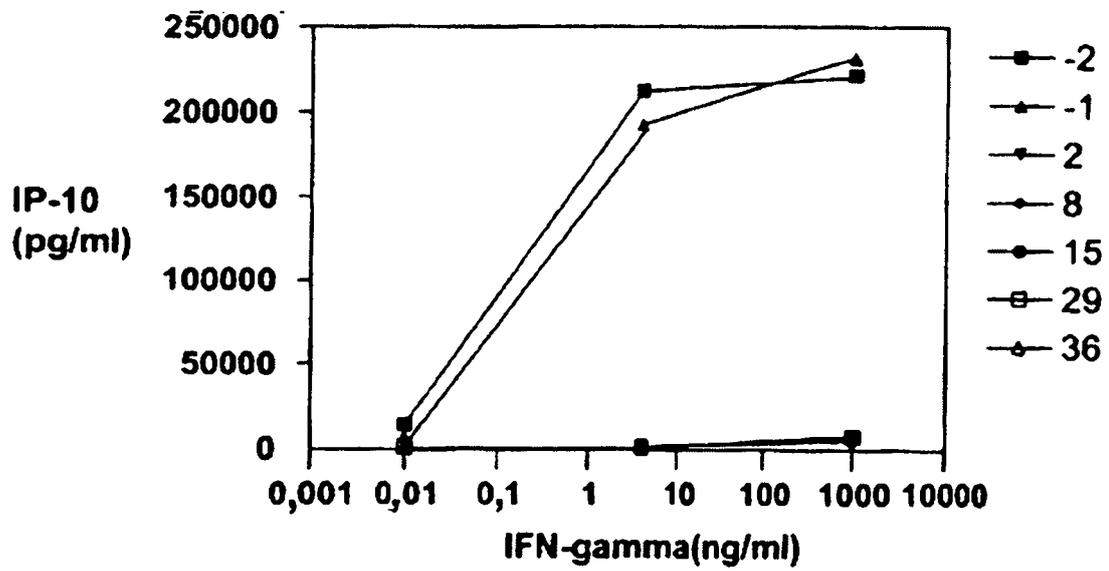
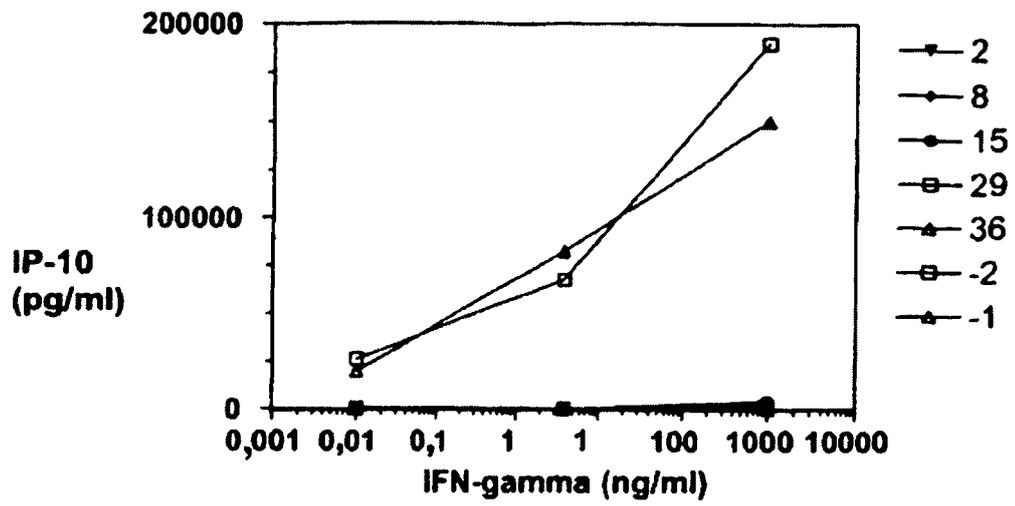


Figura 15



ES 2 370 473 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Amgen, Inc.
Welcher, Andrew
5 Chute, Hilary
Li, Luke
Huang, Haichun

<120> Anticuerpos neutralizantes anti-IFN- γ humanos como inhibidores selectivos de la ruta de IFN- γ

<130> 01-1635-B
<150> Documento US 60/419.057
15 <151> 16-10-2002

<150> Documento US 60/479.241
<151> 17-06-2003
20 <160> 57

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 990
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 1

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
35 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtctg 120
tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240

40

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
45 ccgtcagtet tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccgpacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcttcacc aggactggct gaatggcaag 600
50 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
55 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcccc ctctctctat agcaagctca ccgtggataa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtctcttc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
60 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 2
<211> 330
65 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 370 473 T3

<400> 2

5 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 10 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 15 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 20 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 25 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 30 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 35 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 40 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 45 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 50 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 55 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 60 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3

65 <211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 370 473 T3

<400> 3

```

5      cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct      60
      ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggg caaagtacag      120
      tggaaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
      agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
10     aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag      300
      agcttcaaca ggggagagtg t                                          321

```

<210> 4

15 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 4

```

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

```

<210> 5

45 <211> 351

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 5

```

55     gaggtgcagc tggtagcagc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc      60
      tcctgtaagg gttctggata caactttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
      cccgggaaag gcctggagtt gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac      180
      agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
      ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgg ttcggggagc      300
60     tacttttact tcgatctctg gggccgtggc accctggatc ccgtctctag t                                          351

```

<210> 6

65 <211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 370 473 T3

<210> 9

<211> 351

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

```

10      gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc      60
      tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
      cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac      180
15      agccccctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
      ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgg ttcggggagc      300
      tactggctact tcgatctctg gggccgtggc accctgggtca cctctcttag t      351

```

20

<210> 10

<211> 117

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

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

```

<210> 11

50 <211> 324

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55

<400> 11

```

60      gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
      ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctcct tagcctggta ccagcagaaa      120
      cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
      gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
65      cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cggctcgggtg gctcatcatt cactttcggc      300
      cctgggacca aagtggatat caaa      324

```

ES 2 370 473 T3

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

<210> 13

30 <211> 351

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 13

gaggtgcagc tgggtcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 40 tcctgtaagg gttctggata caactttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtt gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 45 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgg ttcggggagc 300
 tactgggtact tcgatctctg gggccgtggc accctggtca ccgtctctag t 351

<210> 14

50 <211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 14

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

ES 2 370 473 T3

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

5
 10

<210> 15
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctgga ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgcatcca gcaggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cggctctggtg gctcatcatt cactttcggc 300
cctgggacca aagtggatat caaa 324

30

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

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

55

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Gly Gly Ser Ser
 85 90
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

60

<210> 17
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 370 473 T3

<210> 18

<211> 215

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
15 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
15 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
20 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
25 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
30 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Gly Gly Ser Ser
85 90 95
35 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
40 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
45 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
50 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
55 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
60 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
65 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
70 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

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

ES 2 370 473 T3

val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser val Phe Pro Leu
 115 120 125
 5 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 10 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 15 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 20 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 25 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 30 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 35 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 40 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 45 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 50 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

55

<210> 20

<211> 215

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 370 473 T3

<400> 20

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

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

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

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

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

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

20 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

25 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

30 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

35 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

40 <210> 21

<211> 447

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 370 473 T3

<400> 21

5 Glu Val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 10 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Ser Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110
 20 val Thr val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 25 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 30 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 35 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 40 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu val Thr Cys val val val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 val Lys Phe Asn Trp Tyr val Asp Gly val Glu val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 45 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg val val Ser
 290 295 300
 val Leu Thr val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 50 Cys Lys val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 55 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 60 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn val Phe Ser Cys Ser val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 65

ES 2 370 473 T3

<210> 22
 <211> 215
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30 35
 15 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45 50
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60 65
 20 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Gly Gly Ser Ser
 85 90 95 100
 25 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110 115
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125 130
 30 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140 145
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 35 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175 180
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190 195
 40 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205 210
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

45 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido para PCR

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (18)..(23)

<223> n e s a, c, t o g

60 <400> 23

ggccggatag gcctccannn nnnt

24

65

ES 2 370 473 T3

	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido para PCR	
10	<400> 24	
	ggggtcaggc tggaactgag g	21
15		
	<210> 25	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador de oligonucleótido para PCR	
	<400> 25	
30	tgaggacgct gaccacacg	19
	<210> 26	
35	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido para PCR	
45	<400> 26	
	acaacaaagc ttctagacca ccatggaaac cccagctcag cttctctt	48
50		
	<210> 27	
	<211> 33	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido para PCR	
60	<400> 27	
	cttgtcgact caaactcttc ccctggtgaa gct	33
65		

ES 2 370 473 T3

<210> 28

<211> 44

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido para PCR

10

<400> 28

cagcagaagc ttctagacca ccatggggtc aaccgccatc ctcg

15

44

<210> 29

<211> 42

20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> cebador de oligonucleótido para PCR

<400> 29

30

cttggtggag gcactagaga cggtgaccag ggtgccacgg cc

42

<210> 30

<211> 117

35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 30

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

60

<210> 31

<211> 109

65

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 370 473 T3

<400> 31

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

<210> 32

<211>447

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

50

55

60

65

ES 2 370 473 T3

<400> 33

1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 1 5 10 15
 20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ser Ser
 25 20 25 30
 35 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Leu Leu
 40 35 40 45
 50 Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 55 50 55 60
 65 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu
 70 65 70 75 80
 85 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Phe
 90 85 90 95
 100 Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 105 100 105 110
 115 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 120 115 120 125
 130 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 135 130 135 140
 145 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 150 145 150 155 160
 165 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 170 165 170 175
 180 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 185 180 185 190
 195 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 195 200 205
 210 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

40 <210> 34

<211> 5

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

50 Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 35

55 <211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 35

1 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 5 10 15
 65 Gly

ES 2 370 473 T3

<222> (3)..(3)

<223> x es cualquier aminoácido

5 <400> 50

Trp Gly Xaa Gly
1

10

<210> 51

<211> 4

<212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<220>

20

<221> Incierto

<222> (3)..(3)

<223> x es cualquier aminoácido

25

<400> 51

Phe Gly Xaa Gly
1

30

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

40

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly
20

45

<210> 53

<211> 26

50

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

55

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

60

<210> 54

<211> 19

65

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 370 473 T3

<400> 54

5 Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 val Cys Ala

10 <210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 55

20 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly
 20

25

<210> 56

<211> 351

<212> ADN

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

35 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggtcgggt gcgccagatg 120
 40 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggccaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgg ttcggggagc 300
 45 tactggtact tcgatctccg gggccgtggc accctggta ccgtctctag t 351

<210> 57

<211> 327

50

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

55 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattatc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 60 cctggccaga ctcccaggct cctcatctat ggtgtatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgga actcatttat gtacactttt 300
 65 ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327