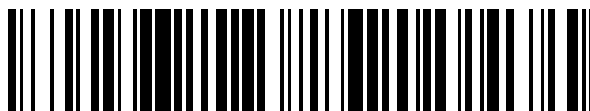


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 062**

51 Int. Cl.:
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02742463 .9**
96 Fecha de presentación: **29.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1362105**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Anticuerpos anti-interferón alfa**

30 Prioridad:
22.02.2001 US 270775 P
09.01.2002 US 44896

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.04.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
CHUNTHARAPAI, Anan;
KIM, Jin, K.;
PRESTA, Leonard, G. y
STEWART, Timothy

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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

ES 2 378 062 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-interferón alfa

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a la generación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-IFN- α neutralizantes con una amplia reactividad contra varios subtipos de IFN- α . La presente invención se refiere además a la utilización de dichos anticuerpos anti-IFN- α en el diagnóstico y tratamiento de trastornos asociados con un aumento de la expresión de IFN- α , en particular, trastornos autoinmunes, tales como diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y lupus eritematoso sistémico (SLE).

15 Descripción de la técnica anterior

Interferón- α (IFN- α)

20 Aunque los interferones se descubrieron inicialmente por su actividad antiviral, posteriores investigaciones han desentrañado una plétora de actividades reguladoras asociadas con estas potentes citoquinas. Los interferones tipo I forman una antigua familia de citoquinas que incluye IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ω e IFN- τ (Roberts et al., J. Interferon Cytokine Res. 18: 805-816 [1998]). Son codificadas por genes sin intrones y están ampliamente distribuidas entre los vertebrados. Mientras que el IFN- β es codificado por un único gen en primates y roedores, se han encontrado más de 10 y 15 subtipos diferentes de IFN- α en ratones y hombres, respectivamente. Otros interferones de tipo I son más limitados, por ejemplo, IFN- δ en el cerdo, IFN- τ en ganado vacuno y ovejas, e IFN- ω en ganado vacuno y humanos. De este modo, los interferones tipo I humanos comprenden múltiples miembros de la familia de IFN- α , y miembros individuales de las familias de IFN- β e IFN- ω . Todos los TFN de tipo I parecen unirse a un único receptor que está comprendido de por lo menos dos proteínas que abarcan la membrana. Los interferones de tipo II, por otro lado, están representados por un único miembro, IFN- γ , y se unen a un receptor distinto.

30 Aunque todos los IFN de tipo I, incluyendo IFN- α , muestran actividades antivirales y antiproliferativas y ayudan así al control de infecciones virales y tumores (Lefevre et al., Biochimie 80: 779-788 [1998]; Horton et al., Cancer Res. 59: 4064-4068 [1999]; Alexenko et al., J. Interferon Cytokine Res. 17: 769-779 [1997]; Gresser, J. Leukoc. Biol. 61: 567-574 [1997]), existen varias enfermedades autoinmunes que están asociadas con una mayor expresión de IFN α , de manera destacada la diabetes melitus insulino dependiente y el lupus eritematoso sistémico (SLE).

35 La diabetes tipo I, también conocida como diabetes autoinmune o diabetes melitus insulino dependiente (IDDM), es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción selectiva de células β pancreáticas por linfocitos T autorreactivos (Bach, Endocr. Rev. 15: 516-542 [1994]; Castano y Eisenbarth, Annu. Rev. Immunol. 8: 647-679 [1990]; Shehadeh y Lafferty, Diabetes Rev. 1: 141-151 [1993]). La patología de la IDDM es muy compleja implicando una interacción entre un suceso epigenético (posiblemente una infección viral), las células β pancreáticas y el sistema inmune en un huésped genéticamente susceptible. Se han implicado un conjunto de citoquinas, incluyendo TFN- α e IFN- γ , en la patogénesis de la IDDM en humanos y en modelos animales de la enfermedad (Campbell et al., J. Clin. Invest. 87: 739-742 [1991]; Huang et al., Diabetes 44: 658-664 [1995]; Rhodes y Taylor, Diabetologia 27: 601-603 [1984]). Por ejemplo, se han descrito la expresión de ARNm de IFN- α pancreático y la presencia de IFN- α inmunoreactivo en células β de pacientes con IDDM (Foulis et al., Lancet 2: 1423-1427 [1987]; Huang et al., [1995] supra; Somoza et al., J. Immunol. 153: 1360-1377 [1994]). La expresión de IFN- α se ha asociado con la hiperexpresión de antígenos de clase IA del en islotes humanos (Foulis et al., [1987] supra; Somoza et al., [1994] supra). En dos modelos de roedores de diabetes autoinmunes, la rata DP-BB propensa a la diabetes y los ratones tratados con estreptozotocina, la expresión de ARNm de IFN- α en islotes precede a la insulinitis y la diabetes (Huang et al., Immunity 1: 469-478 [1994]). Además, los ratones transgénicos que albergan una construcción de promotor de insulina humana-IFN- α desarrollan una diabetes hipoinsulinémica acompañada de insulinitis (Stewart et al., Science 260: 1942-1946 [1993]).

55 Parece que la expresión local de IFN- α por células de islotes pancreáticos en respuesta potenciales estímulos diabetogénicos, tales como virus, puede desencadenar el proceso insulítico. En concordancia con su papel como agente iniciador, se ha observado que el IFN- α induce la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y HLA clase IA en células endoteliales de islotes humanos, que pueden contribuir a la infiltración de leucocitos durante la insulinitis (Chakrabarti et al., J. Immunol. 157: 522-528 [1996]). Además, el IFN- α facilita la estimulación de células T mediante la inducción de las moléculas coestimuladoras ICAM-1 y B7.2 en células presentadoras de antígenos en islotes (Chakrabarti et al., Diabetes 45: 1336-1343 [1996]). Estos estudios indican colectivamente que la expresión temprana de IFN- α por células β puede ser un suceso crítico en el inicio de la diabetes autoinmune. Aunque existen artículos que implica el IFN- γ en el desarrollo de IDDM en modelos de roedores, existe una escasa correlación entre la expresión de esta citoquina y la IDDM humana. De este modo, las células que expresan IFN- γ se pueden hallar en

los islotes de un subgrupo de pacientes humanos seleccionados por una infiltración linfocítica significativa en los islotes. En un grupo de pacientes que no se seleccionaron por este criterio, no hubo una asociación obvia entre la expresión de IFN- γ y la IDDM humana.

En base a este nivel incrementado de expresión de IFN- α en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE), el IFN- α también se ha implicado en la patogénesis de SLE (Ytterberg y Schnitzer, *Arthritis Rheum.* 25: 401-406 [1982]; Shi et al., *Br. J. Dermatol.* 117: 155-159 [1987]). Es interesante indicar que el IFN- α se utiliza actualmente para el tratamiento del cáncer, así como de infecciones virales, tales como la hepatitis crónica debido a la infección del virus de la hepatitis B o hepatitis C. En concordancia con las observaciones niveles incrementados de IFN- α que desencadena la autoinmunidad, se ha descrito un aumento significativo en la aparición de trastornos autoinmunes, tales como IDDM, SLE y tiroiditis autoinmunes en los pacientes que se someten a terapia con IFN- α . Por ejemplo, se ha observado que un uso prolongado de IFN- α como terapia antiviral induce la IDDM (Waguri et al., *Diabetes Res. Clin. Pract.* 23: 33-36 [1994]; Fabris et al., *J. Hepatol.* 28: 514-517 [1998]) o SLE (Garcia-Porrúa et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 107-108 [1998]). El tratamiento de la infección por el virus de coxsackie B con terapia con IFN- α también está asociada con la inducción de IDDM (Chehadeh et al., *J. Infect. Dis.* 181: 1929-1939 [2000]). De manera similar, existen múltiples artículos de casos que documentan la IDDM o SLE en pacientes de cáncer tratados con IFN- α (Ronnblom et al., *J. Intern. Med.* 227: 207-210 [1990]).

Terapia con anticuerpos

La utilización de anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos ha ganado mayor aceptación con varios anticuerpos monoclonales (mAbs) aprobados para uso humano o en pruebas clínicas en las últimas fases. El primer mAb aprobado por la US Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del rechazo de aloinjertos fue el anti-CD3 (OKT3) en 1986. Desde entonces, el ritmo del progreso en el campo de los mAbs se ha acelerado considerablemente, particularmente desde 1994 en adelante lo que condujo a la aprobación de siete mAbs adicionales para el tratamiento humano. Estos incluyen ReoPro® para el tratamiento de complicaciones de angioplastia coronaria en 1994, Zenapax® (anti-CD25) para la prevención del rechazo de aloinjertos en 1997, Rituxan® (anti-CD20) para el tratamiento de linfoma de de Hodgkin de células B en 1997, Infliximab® (anti-TNF- α) inicialmente para el tratamiento de la enfermedad de Crohn en 1998 y posteriormente para el tratamiento de la artritis reumatoide en 1999, Simulect® (anti-CD25) para la prevención del rechazo de aloinjertos en 1998, Synagis® (anti-proteína F del virus respiratorio sincitial) para el tratamiento de infecciones respiratorias en 1998, y Herceptin® (anti-HER2/neu) para el tratamiento de tumores de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 en 1998 (Glennie y Johnson, *Immunol. Today* 21: 403-410 [2000]).

Anticuerpos anti-IFN- α

Los estados patológicos que son susceptibles de intervención con mAbs incluyen aquellos en los que existe un nivel patológico de un antígeno diana. Por ejemplo, un anticuerpo que neutraliza el IFN- α presente en el suero de pacientes con SLE, y es expresado por los islotes pancreáticos en IDDM, es un candidato potencial para la intervención terapéutica en estas enfermedades. También se podría utilizar para la intervención terapéutica en otras enfermedades autoinmunes con un incremento subyacente y un papel causal de la expresión de IFN- α . En ambas IDDM humanas (Foulis, et al., *Lancet* 2: 1423-1427 [1987]; Huang, et al., *Diabetes* 44: 658-664 [1995]; Somoza, et al., *J. Immunol.* 153: 1360-1377 [1994]) y la SLE humana (Hooks, et al., *Arthritis & Rheumatism* 25: 396-400 [1982]; Kim, et al., *Clin. Exp. Immunol.* 70: 562-569 [1987]; Lacki, et al., *J. Med.* 28: 99-107 [1997]; Robak, et al., *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46: 375-380 [1998]; Shiozawa, et al., *Arthritis & Rheumatism* 35: 417-422 [1992]; von Wussow, et al., *Rheumatology International* 8: 225-230 [1988]) parece haber una correlación entre la enfermedad y el IFN- α , pero no con IFN- β o IFN- γ . De este modo, la intervención de mAb anti-interferón en IDDM o SLE requeriría una neutralización específica de la mayoría, si no todos, los subtipos de IFN- α , sin ninguna neutralización significativa de IFN- β o IFN- γ . El dejar intacta la actividad de estos dos últimos interferones también puede tener ventajas al permitir la retención de una actividad anti-viral significativa.

Aunque se han descritos varios mAbs que muestran reactividad con un conjunto de subtipos de IFN- α humanos recombinantes, se observó que éstos neutralizaban sólo un subgrupo limitado de los subtipos de IFN- α recombinantes analizados o no eran capaces de neutraliza la mezcla de subtipos de IFN- α que son producidos por leucocitos de sangre periférica estimulados (Tsukui et al., *Microbiol. Immunol.* 30: 1129-1139 [1986]; Berg, J. *Interferon Res.* 4: 481-491 [1984]; Meager y Berg, J. *Interferon Res.* 6: 729-736 [1986]; Patente de Estados Unidos No. 4,902,618; y publicación EP No. 0,139,676 B1).

Por consiguiente, existe una gran necesidad de anticuerpos anti-IFN- α que no sólo se unan a la mayoría, preferiblemente todos, los subtipos de IFN- α , sino que también neutralicen dichos subtipos, a la vez que no interfieran con la función biológica de otros interferones.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de un anticuerpo monoclonal que se halló experimentalmente que

neutralizaba los siete subtipos diferentes de IFN- α humanos recombinantes analizados y dos grupos independientes de subtipos de IFN- α humanos naturales.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano que se une y neutraliza una actividad biológica de por lo menos los subtipos IFN- α humanos IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10 e IFN- α 21. El anticuerpo de la invención comprende:

- (A) por lo menos una cadena ligera o un fragmento de la misma, que comprende las siguientes CDR:
 - (a) L1 de la fórmula RASQSVSTSSYSYMH (SEC ID NO:7);
 - (b) L2 de la fórmula YASNLES (SEC ID NO:8); y
 - (c) L3 de la fórmula QHSWGIPRTF (SEC ID NO:9); y
- (B) por lo menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, que comprende las siguientes CDR:
 - (a) H1 de la fórmula GYTFTEYIIH (SEC ID NO:10);
 - (b) H2 de la fórmula SINPDYDITNYNQRFKG (SEC ID NO:11); y
 - (c) H3 de la fórmula WISDFFDY (SEC ID NO:12).

El anticuerpo de la invención puede reducir o eliminar significativamente una actividad biológica del IFN- α humano en cuestión. El anticuerpo de la invención puede ser capaz de neutralizar por lo menos un 60%, o por lo menos un 70%, preferiblemente por lo menos un 75%, más preferiblemente por lo menos un 80%, incluso más preferiblemente por lo menos un 85%, aún más preferiblemente por lo menos un 90%, aún más preferiblemente por lo menos un 95%, lo más preferiblemente por lo menos un 99% de una actividad biológica del IFN- α humano en cuestión. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal neutralizante de la actividad biológica de IFN- α humano no neutraliza la actividad biológica correspondiente de IFN- β humano.

La actividad biológica de los IFN- α humanos en cuestión puede ser la actividad de unión a IFNAR2. El anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano puede ser capaz de unirse y bloquear por lo menos un 60%, o por lo menos un 70%, preferiblemente por lo menos un 75%, más preferiblemente por lo menos un 80%, incluso más preferiblemente por lo menos un 85%, aún más preferiblemente por lo menos un 90%, aún más preferiblemente por lo menos un 95%, lo más preferiblemente por lo menos un 99% de la actividad de unión a IFNAR2 de todos, o sustancialmente todos los subtipos de IFN- α humanos. El anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano puede ser capaz de unirse y bloquear por lo menos un 60%, o por lo menos un 70%, preferiblemente por lo menos un 75%, más preferiblemente por lo menos un 80%, incluso más preferiblemente por lo menos un 85%, aún más preferiblemente por lo menos un 90%, aún más preferiblemente por lo menos un 95%, lo más preferiblemente por lo menos un 99% de la actividad de unión a IFNAR2 de cada uno de los subtipos de IFN- α 1, 2, 4, 5, 8, 10 y 21 humanos.

La actividad biológica de los IFN- α humanos en cuestión puede ser una actividad antiviral. El anticuerpo puede ser capaz de unirse y neutralizar la actividad viral de todos, o sustancialmente todos, los subtipos de IFN- α humanos. El anticuerpo puede ser capaz de unirse y neutralizar la actividad antiviral de cada uno de los subtipos de IFN- α 1, 2, 4, 5, 8, 10 y 21 humanos. El anticuerpo puede ser capaz de unirse y neutralizar por lo menos un 60%, o por lo menos un 70%, preferiblemente por lo menos un 75%, más preferiblemente por lo menos un 80%, incluso más preferiblemente por lo menos un 85%, incluso más preferiblemente por lo menos un 90%, incluso más preferiblemente por lo menos un 95%, lo más preferiblemente por lo menos un 99% de la actividad antiviral de todos, o sustancialmente todos, los subtipos de IFN- α humanos. El anticuerpo se puede unir y neutralizar por lo menos un 60%, o por lo menos un 70%, o por lo menos un 75%, o por lo menos un 80%, o por lo menos un 85%, o por lo menos un 90%, o por lo menos un 95%, o por lo menos un 99% de la actividad viral de cada uno de los subtipos de IFN- α 1, 2, 4, 5, 8, 10 y 21 humanos.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, humanizado o quimérico. El anticuerpo puede ser el anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano 9F3 o una versión humanizada del mismo, tal como la versión 13 (V13) o la forma quimérica del mismo. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-IFN- α producido por la línea celular de hibridoma murino 9F3.18.5 depositada con la ATCC el 18 de enero del 2001 y que tiene el número de acceso No. PTA-2917. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano murino o quimérico murino/humano que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera murina mostrada en la figura 5A (SEC ID NO:1) y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada murina mostrada en la figura 5B (SEC ID NO:2). En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera humanizada mostrada en la figura 5A (SEC ID NO:3) y la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada humanizada mostrada en la figura 5B (SEC ID NO:5).

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislado, una célula huésped transformada con la molécula de ácido nucleico, y un método de producción del anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped bajo condiciones en las que la molécula de ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula huésped. El anticuerpo puede ser de la clase IgG e isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. El alcance de la invención también cubre fragmentos de anticuerpos, tales como

fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, y Fab'.

En esta memoria, los CDR son tal como se definen por Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD [1991], vols. 1-3.

El anticuerpo puede ser una estructura homo-tetramérica compuesta de dos pares de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo unidos por puentes disulfuro. El alcance de la invención incluye específicamente un anticuerpo lineal, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado. También se proporciona un anticuerpo quimérico que comprende (A) la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera quimérica ratón/humano, o la secuencia completa de aminoácidos del polipéptido de cadena ligera quimérica, codificada por el vector XAIFN-ChLpDR1 depositado con la ATCC el 9 de junio de 2001 que tiene el No. de acceso PTA-2880; y (B) la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada quimérica ratón/humano, o la secuencia completa de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada quimérica, codificada por el vector XAIFN-ChHpDR2 depositado con la ATCC el 9 de junio de 2001 que tiene el No. de acceso PTA-2883. Adicionalmente, se proporciona aquí un anticuerpo humanizado que comprende (1) la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera humanizado, codificada por el vector VLV30-IgG depositado con la ATCC el 9 de enero del 2001 y que tiene el número de acceso PTA-2882; y (2) la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada humanizado, codificada por el vector VHV30-IgG2 depositado con la ATCC el 9 de enero del 2001 y que tiene el número de acceso PTA-2881.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto diferente, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico de una patología asociada con la expresión de IFN- α en una célula aislada, que comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo anti-IFN- α , y detectar la presencia de IFN- α .

El anticuerpo de la invención se puede utilizar en un método para el tratamiento de una enfermedad o patología asociada con la expresión de IFN- α en un paciente. El paciente es un paciente mamífero, preferiblemente un paciente humano. La enfermedad es una enfermedad autoinmune, tal como diabetes melitus insulino dependiente (IDDM); lupus eritematoso sistémico (SLE); o tiroiditis autoinmune.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama esquemática de la estrategia utilizada para el desarrollo de los anticuerpos monoclonales anti-IFN- α humano.

La figura 2 muestra que un mAb anti-IFN- α humano murino (9f3) es capaz de neutralizar un espectro de subtipos de IFN- α recombinantes, pero no IFN- β recombinante. Los IFN indicados se analizaron por la inhibición del crecimiento viral de la encefalomiocarditis (EMC) en células A549 en presencia de concentraciones crecientes del mAb 9F3. Los datos se presentan como el porcentaje de la actividad de inhibición del crecimiento viral obtenida con el IFN indicado en ausencia de mAb 9F3.

Las figuras 3A-3B muestran la neutralización de interferón de leucocitos (Sigma) (figura 3A) interferón de linfoblastoides (NIH referencia Ga23-901-532) (figura 3B). En la figura 3A, se incubaron 20.000 IU/ml (barras rellenas) o 5.000 IU/ml (barras blancas) de interferón de leucocitos (Producto Sigma No. I-2396) con el blanco de control (sólo tampón) (indicado como "-"), 10 :g/ml de IgG de ratón de control (indicado como "mlgG"), o 10 :g/ml de mAb 9F3 (indicado como "9F3"). Las diluciones se analizaron y se mostró la cantidad de actividad restante. Los resultados mostrados son los promedios de las determinaciones por duplicado. En la figura 3B, se analizó el interferón de linfoblastoides (NIH referencia Ga23-901-532) a 10 (columnas rellenas) o 3 (columnas blancas) IU/ml en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de mAb 9F3. Un efecto citopático superior es indicativo de un descenso en la actividad de interferón. Los resultados mostrados son los promedios de las determinaciones por duplicado.

La figura 4 representa los resultados de un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) que muestra la inducción de un complejo ISGF3/ISRE por IFN- α y la capacidad del mAb 9F3 de evitar la formación del complejo. El EMSA se realizó en presencia o ausencia de IFN- α 2 humano (indicado como " α 2") o IFN- γ (indicado como " γ ") a una concentración de 25 ng/ml con mAb 9F3 (indicado como "9F3") o anticuerpo de control IgG murino (indicado como "IgG") a una concentración de 10 :g/ml.

La figura 5A muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de 9F3 murino (murino, SEC ID NO: 1), la versión 13 de 9F3 humanizado (V 13, SEC ID NO:3), y el subgrupo I de la cadena ligera κ del dominio variable humano de consenso (hukl, SEC ID NO: 4). Las CDR (L1, SEC ID NO: 7; L2, SEC ID NO: 8; y L3, SEC ID NO: 9) están destacadas mediante subrayado. La numeración de los residuos es según Kabat et al., (1991) supra. Las diferencias entre las secuencias de 9F3 murino y V13 y las diferencias entre las secuencias de 9F3 y hukl se indican mediante asteriscos.

La figura 5B muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de 9F3 murino (murino, SEC ID NO: 2), la versión 13 de 9F3 humanizado (V 13, SEC ID NO:5), y el subgrupo III de la cadena pesada del dominio variable humano de consenso (hulIII, SEC ID NO: 6). Las CDR (H1, SEC ID NO: 10; H2, SEC ID NO: 11; y H3, SEC ID NO: 12) están destacadas mediante subrayado. La numeración de los residuos es según Kabat et al., (1991) supra. Las diferencias entre las secuencias de 9F3 murino y V13 y las diferencias entre las secuencias de 9F3 y hulIII se indican mediante asteriscos.

La figura 6 muestra la actividad de neutralización del mAb 9F3 de partida (panel izquierdo) y la proteína quimérica CH8-2 (panel derecho) hacia la inhibición del crecimiento viral mostrado por los subtipos de IFN- α recombinantes en células A549 estimulados con virus de encefalomiocarditis (EMC).

La figura 7 representa un modelo de versión 13 de 9F3 humanizado. El esqueleto de los dominios VL y VH se muestran como un lazo. Las CDR se muestran en blanco y están marcadas (L1, L2, L3, H1, H2, H3). Las cadenas laterales alteradas de los armazones de humano a murino se muestran en blanco y están marcadas por el número de residuo.

Descripción detallada de la realización preferida

A. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados aquí tiene el mismo significado entendido normalmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Véase, por ejemplo, Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Para los objetivos de la presente invención se definen a continuación los siguientes términos.

Tal como se utiliza aquí, el término "interferón tipo I" se define que incluye todos los subtipos de interferones de tipo I de secuencia nativa de cualquier especie de mamífero, incluyendo interferón- α , interferón- β , interferón- δ , interferón- ω e interferón- τ . De forma similar, el término "interferón de tipo I humano" se define que incluye todos los subtipos de interferones humanos de tipo I de secuencia nativa, incluyendo las clases de interferón- α , interferón- β e interferón- ω humano y que se unen a un receptor celular común.

A menos que se indique expresamente lo contrario, los términos "interferón- α ", "IFN- α ", e "interferón- α humano", "IFN- α humano" y "hIFN- α " se utilizan aquí para referirse a todas las especies de interferones alfa humanos de secuencia nativa, incluyendo todos los subtipos de interferones- α humanos de secuencia nativa. El interferón- α humano natural (secuencia nativa) comprende 23 o más proteínas estrechamente relacionadas codificadas por distintos genes con un alto grado de homología estructural (Weissmann y Weber, Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 33: 251 [1986]; J. Interferon Res., 13: 443-444 [1993]; Roberts et al., J. Interferon Cytokine Res. 18: 805-816 [1998]). El locus de IFN- α humano comprende dos subfamilias. La primera subfamilia consiste en por lo menos 14 genes no alélicos funcionales, incluyendo genes que codifican IFN- α A (IFN- α 2), IFN- α B (IFN- α 8), IFN- α C (IFN- α 10), IFN- α D (IFN- α 1), IFN- α E (IFN- α 22), IFN- α F (IFN- α 21), IFN- α G (IFN- α 5), e IFN- α H (IFN- α 14), y pseudogenes que tiene por lo menos un 80% de homología. La segunda subfamilia, α_{II} o T, contiene por lo menos 5 pseudogenes y un gen funcional (indicado aquí como "IFN- α 111" o "IFN-T") que muestra un 70% de homología con los genes de IFN- α (Weissmann and Weber [1986] supra).

Tal como se utiliza aquí, los términos "primer receptor de interferón- α humano (hIFN- α)", "IFN- α R", "hIFNAR1", "IFNAR1", y "cadena Uze" se definen como la proteína receptora de 557 aminoácidos clonada por Uze et al., Cell, 60: 225-234 (1990), incluyendo un dominio extracelular de 409 residuos, un dominio transmembrana de 21 residuos, y un dominio intracelular de 100 residuos, tal como se muestra en la figura 5 en la página 229 de Uze et al. También están comprendidos por los términos anteriores fragmentos de IFNAR1 que contienen el dominio extracelular (ECD) (o fragmentos del ECD) de IFNAR1.

Tal como se utiliza aquí, los términos "segundo receptor de interferón- α (hIFN- α) humano", "IFN- α β R", "hIFNAR2", "IFNAR2", y "cadena Novick" se definen como la proteína receptora de 515 aminoácidos clonada por Domanski et al., J. Biol. Chem., 37: 21606-21611 (1995), incluyendo un dominio extracelular de 217 residuos, un dominio transmembrana de 21 residuos, y un dominio intracelular de 250 residuos, tal como se muestra en la figura 1 en la página 21608 de Domanski et al. También están comprendidos por los términos anteriores fragmentos de IFNAR2 que contienen el dominio extracelular (ECD) (o fragmentos del ECD) de IFNAR2, y formas solubles de IFNAR2, tales como ECD de IFNAR2 ECD fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, por ejemplo IFNAR2 ECD IgG Fc tal como se describe a continuación.

El término "secuencia nativa" en relación con interferón tipo I, IFN- α o cualquier otro polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido correspondiente derivado de la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Dicho polipéptido de secuencia nativa se puede aislar

de la naturaleza por medios recombinantes y/o sintéticos o cualquier combinación de los mismos. El término "secuencia nativa" comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales (por ejemplo una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de empalme alternativo) y variantes alélicas naturales de los polipéptidos de longitud completa. "Reacción encadena de la polimerasa" o "PCR" se refieren a un procedimiento o técnica en que cantidades pequeñas de una pieza específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 4,683,195 concedida el 28 de julio de 1987. En general, la información de la secuencias de los extremos de la región de interés o más allá necesita estar disponible, de manera que se pueden diseñar cebadores de oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en la secuencia a cadenas opuestas de la plantilla a amplificar. Los nucleótidos terminales en 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede utilizar para amplificar las secuencias específicas de ARN, las secuencias específicas de ADN del ADN genómico total y el ADN transcrito del ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase, en general, Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology (Stockton Press, NY, 1989). Tal como se utiliza aquí, es considerada como uno, pero no el único, ejemplo de un método de reacción de la ácido nucleico polimerasa para amplificar una muestra de prueba de ácidos nucleicos que comprende la utilización de un ácido nucleico conocido como cebador y una ácido nucleico polimerasa para amplificar o generar una pieza específica de ácido nucleico.

"Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tiene las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran una especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad a antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles elevados por los mielomas.

"Anticuerpos e inmunoglobulinas nativas" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligera (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineada con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651 [1985]; Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4592 [1985]; Chothia et al., Nature 342: 877-883 [1989]).

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos, denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales o armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR que, en gran parte, adoptan una configuración de lámina- β conectadas por tres CDR que forman hélices que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina- β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas y muy próximas por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al. (1991) supra). Los dominios constantes no participan directamente en el proceso de unión al antígeno de un anticuerpo, pero muestran diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía es capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de las cadenas pesadas y cadenas ligeras en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cada una, el dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera pueden estar unido covalentemente por un péptido enlazador flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero de VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que sólo comprende tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de las cadenas pesadas que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos llamados kappa (κ) y lambda (λ) basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de éstos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas.

El término "anticuerpo" incluye todas las clases y subclases de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también cubre fragmentos de anticuerpos. El término "anticuerpo" cubre específicamente anticuerpos monoclonales, incluyen clones de fragmentos de anticuerpos.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto que contiene la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diabodies; moléculas de anticuerpo de cadena única, incluyendo moléculas Fv de cadena única (scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención, se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también incluyen clones de fragmentos de anticuerpos (clones de Fv) que contienen sitios de reconocimiento o unión a antígeno aislados de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Entre los anticuerpos monoclonales aquí descritos se incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567 de Cabilly et al.; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o armazón importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y optimizar la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de, como mínimo, uno, y

habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992); y Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PrimatizadoTM en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macaco con el antígeno de interés.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. En general, el polipéptido scFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994), Dall'Acqua y Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450 (1998), y Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557 (1999).

El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico o terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

Por "anticuerpo neutralizante" se entiende una molécula de anticuerpo que es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efectora de un antígeno diana al que se une. Por consiguiente, un anticuerpo anti-IFN- α "neutralizante" es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efectora, tal como la unión a receptor y/o la obtención de una respuesta celular, de IFN- α .

Para los objetivos de la presente invención, se puede monitorizar la capacidad de un anticuerpo anti-IFN- α de neutralizar la actividad de activación del receptor de IFN- α , por ejemplo, en un Ensayo de Activación de Receptor Quinasa (KIRA) tal como se describe en WO95/14930, publicada el 1 de junio de 1995, midiendo la capacidad de un anticuerpo candidato para reducir la fosforilación de tirosina (resultante de la unión a ligando) del complejo de receptores IFNAR1/2.

Para los objetivos de la presente invención, la capacidad de los anticuerpos anti-IFN- α de neutralizar la obtención de una respuesta celular por IFN- α se analiza preferiblemente monitorizando la neutralización de la actividad antiviral de IFN- α , tal como se describe por Kawade, J. *Interferon Res.* 1:61-70 (1980), o Kawade y Watanabe, J. *Interferon Res.* 4:571-584 (1984), o Yousefi, et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 83: 735-740 (1985), o analizando la capacidad de un anticuerpo anti-IFN- α de neutralizar la capacidad de IFN- α activar la unión de la molécula de señalización, factor 3 estimulada por interferón (ISGF3), a un oligonucleótido derivado del elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE), en un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética, tal como se describe por Kurabayashi et al., *Mol. Cell Biol.*, 15: 6386 (1995).

Reducción "significativa" significa por lo menos aproximadamente un 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95%, lo más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 99% de reducción de una función efectora del antígeno diana (por ejemplo, IFN- α), tal como la unión a receptor (por ejemplo, IFNAR2) y/o obtención de una respuesta celular. Preferiblemente, los anticuerpos "neutralizantes" tal como se definen aquí serán capaces de neutralizar por lo menos aproximadamente un 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, incluso más preferiblemente por lo menos

aproximadamente 95%, lo más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 99% de la actividad antiviral de IFN- α , tal como se determina mediante el ensayo anti-viral de Kawade (1980), supra, o Yousefi (1985), supra. En otra realización preferida, los anticuerpos "neutralizantes" del presente documento serán capaces de reducir la fosforilación de tirosina, debido a la unión a IFN- α , del complejo de receptores IFNAR1/IFNAR2, en por lo menos aproximadamente un 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%; incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95%, lo más preferiblemente por lo menos aproximadamente 99%, tal como se determinar en el ensayo KIRA descrito anteriormente. En una realización particularmente preferida, los anticuerpos anti-IFN- α neutralizantes del presente documento serán capaces de neutralizar todos, o sustancialmente todos, los subtipos de IFN- α y no serán capaces de neutralizar IFN- β . En este contexto, el término "sustancialmente todo" significa que el anticuerpo anti-IFN- α neutralizante neutralizará por lo menos IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10, e IFN- α 21.

Para los objetivos de la presente invención, la capacidad de un anticuerpo anti-IFN- α de bloquear la unión de un receptor se define como la propiedad o capacidad de una cierta concentración del anticuerpo para reducir o eliminar la unión de IFN- α a IFNAR2 en un ensayo de unión por competición, en comparación con el efecto de una concentración equivalente de anticuerpo de control irrelevante en la unión de IFN- α a IFNAR2 en el ensayo. Preferiblemente, el anticuerpo anti-IFN- α bloqueante reduce la unión de IFN- α a IFNAR2 en por lo menos aproximadamente un 50%, o por lo menos aproximadamente 55%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 65%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos aproximadamente 75%, o por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 85%, o por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%, o por lo menos aproximadamente 99%, en comparación con el anticuerpo de control irrelevante.

Para los objetivos de la presente invención, se puede determinar la capacidad de un anticuerpo anti-IFN- α de bloquear la unión de IFN- α a IFNAR2 mediante un ensayo de competición de rutina, tal como el descrito en Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Por ejemplo, el ensayo de ELISA de unión a IFN- α descrito en el ejemplo 2 a continuación se podía modificar para utilizar la unión por competición entre un anticuerpo anti-IFN- α y un IFNAR2 soluble. Dicho ensayo se podría realizar mediante la deposición en capas del IFN- α en placas de microtitulación, la incubación de las placas en capas con diluciones en serie de anticuerpo anti-IFN- α no marcado o anticuerpo de control no marcado mezclado con una concentración seleccionada de proteína de fusión marcada de ECD de IFNAR2-Fc de IgG humana, la detección y medición de la señal en cada mezcla de incubación, y a continuación la comparación de las mediciones de la señal mostrada por las diversas diluciones del anticuerpo.

En una realización particularmente preferida, los anticuerpos anti-IFN- α bloqueantes del presente documento serán capaces de bloquear la unión a IFNAR2 de todos, o sustancialmente todos, los subtipos de IFN- α y reaccionará de forma cruzada con IFN- β . En este contexto, el término "sustancialmente todos" significa que el anticuerpo anti-IFN- α bloqueante bloqueará la unión a IFNAR2 de por lo menos IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10, e IFN- α 21. En una realización particularmente preferida, los anticuerpos anti-IFN- α bloqueantes de la presente invención bloquearán la unión a IFNAR2 de todos los subtipos conocidos de IFN- α .

El término "epítipo" se utiliza para referirse a sitios de unión para anticuerpos (monoclonales o policlonales) en antígenos de proteínas.

Los anticuerpos que se unen a un epítipo particular se pueden identificar mediante "localización de epítipo". Existen muchos métodos conocidos en la técnica para localizar y caracterizar la localización de epítipos en proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos, y ensayos basados en péptidos sintéticos, tal como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Los ensayos de competición se describen anterior y posteriormente. Según los ensayos de expresión fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica la proteína se fragmenta aleatoriamente o mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de la proteína con el anticuerpo a analizar. Los fragmentos génicos se pueden producir, por ejemplo, mediante PCR y a continuación transcribir y traducir en proteína in vitro, en presencia de aminoácidos radioactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de proteína marcada radioactivamente se determina a continuación mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También se pueden identificar ciertos epítipos utilizando amplias bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias expresadas en la superficie de partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, se puede analizar una biblioteca definida de fragmentos peptídicos solapantes por la unión al anticuerpo de análisis en ensayos de unión simple. La última estrategia es adecuada para definir epítipos lineales de 5 a 15 aminoácidos.

Un anticuerpo se une "esencialmente al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia, cuando los dos anticuerpos reconocen epítipos idénticos o estéricamente solapantes. Los métodos más ampliamente utilizados y rápidos para determinar si dos epítipos se unen a epítipos idénticos o estéricamente solapantes son ensayos de competición,

que se pueden configurar en diferentes formatos, utilizando antígeno marcado o anticuerpo marcado. Normalmente, el antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos y se mide la capacidad de anticuerpos no marcados de bloquear la unión de anticuerpos marcados utilizando marcadores radiactivos o enzimáticos.

5 El término aminoácido o residuo de aminoácido, tal como se utiliza aquí, se refiere a L-aminoácidos naturales o a D-aminoácidos descritos a continuación con respecto a las variantes. En el presente documento se utilizan para los aminoácidos las abreviaturas de una y tres letras utilizadas habitualmente (Bruce Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York (3d ed. 1994)).

10 El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptidos referidos en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en una secuencia, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación
15 con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y su código fuente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South
20 San Francisco, California y el código fuente para el programa ALIGN-2 y las instrucciones para su utilización des describen en la Publicación de Solicitud Internacional No. WO2000/39297 publicada el 6 de julio del 2000. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

30 Para los objetivos de la presente invención, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

40 donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe anteriormente utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCI-BLAST-2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCI-BLAST2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, donde todos estos parámetros de búsqueda se fijan a los valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, "unmask (desenmascarado) = yes (sí)", "strand (hebra) = all (todas)", "expected occurrences (sucesos esperados) = 10", "minimum low complexity length (longitud mínima de complejidad baja) = 15/5", "multi-pass e-value (e-valor de multipaso) = 0,01", "constant for multi-pass (constante de multi-paso) = 25", "dropoff for final gapped alignment (disminución para alineación con espacios final) = 25" y "scoring matrix (matriz de puntuación) = BLOSUM 62".

55 En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

65 donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es

igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

El término "estado patológico" se refiere a un estado fisiológico de una célula o de un mamífero completo en que ha tenido lugar una interrupción, cese, o trastorno de funciones celulares o del organismo, sistemas u órganos.

El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar (incluyendo la prevención) de una enfermedad, trastorno o condiciones fisiológicas no deseadas en un mamífero. En la presente invención, una "cantidad efectiva" de un anticuerpo IFN- α puede reducir, ralentizar o retrasar un trastorno autoinmune, tal como IDDM o SLE; reducir, evitar o inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) el desarrollo de un trastorno autoinmune, tal como IDDM o SLE; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con trastornos autoinmunes, tales como IDDM o SLE.

En los métodos de la presente invención, el término "control" y las variantes gramaticales del mismo, se utilizan para referirse a la prevención, inhibición parcial o completa, reducción, retrado o ralentización de un suceso no deseado, por ejemplo, patología fisiológica, tal como la generación de células T autoreactivas y el desarrollo de autoinmunidad.

"Tratamiento" se refiere tanto a tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad del tratamiento incluyen aquellos que ya piden el trastorno, como aquellos propensos a padecer el trastorno o aquellos en los que se debe evitar el trastorno. Para los objetivos de la invención, entre los resultados clínicos beneficiosos o deseados se incluyen, pero sin limitación, el alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión) ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan el tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la patología o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la patología o trastorno o aquellos en los que debe evitarse la patología o trastornos.

Portadores, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada en el pH. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraponos formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TweenTM, polietilenglicol (PEG), y PluronicTM.

"Mamífero" para los objetivos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, competición, domésticos, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

B. Métodos para llevar a cabo la invención

1. Generación de anticuerpos

(i) Anticuerpos policlonales

Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se inmuniza, tal como albúmina de

suero o inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM

En otra realización preferida, los animales se inmunizan con una mezcla de varios subtipos de IFN- α , preferiblemente todos, a efectos de generar anticuerpos anti-IFN- α con una reactividad amplia contra los subtipos de IFN- α . En otra realización preferida, los animales se inmunizan con la mezcla de subtipos de IFN- α humanos que está presente en los interferones linfoblastoides humanos secretados por células de linfoma de Burkitt (células Namalva) inducido con el virus de Sendai virus, tal como se describe en el ejemplo 1 siguiente. Se puede obtener comercialmente una preparación adecuada de dichos interferones linfoblastoides humanos (Producto No. I-9887) de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

(ii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOP-21 y MC.-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, las células se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario

de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 [1984]), o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. En esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α del presente documento.

Habitualmente, dichos polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene la especificidad para un IFN- α y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar in vitro utilizando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

La producción recombinante de anticuerpos se describirá en detalle a continuación.

(iii) Anticuerpos humanizados

En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren habitualmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), revisado en Clark, Immunol. Today 21: 397-402 [2000].

Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Cabilly, supra), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Es importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo la afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y muestran las probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El examen de estas observaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias consenso e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseada, tal como mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y mayoritariamente sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígeno. Para más detalles, véase la patente de Estados Unidos No. 5.821.337

(iv) Anticuerpos humanos

Los intentos de usar la misma tecnología para generar mAb humanos han estado obstaculizados por la falta de una línea celular de mieloma humano adecuada. Se han obtenido los mejores resultados usando heteromielomas (mielomas híbridos de ratón x ser humano) como compañeros de fusión (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur, et al., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", pág. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987). Como alternativa, las células secretoras de anticuerpo humano pueden inmortalizarse mediante infección con virus de Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, las células infectadas con EBV son difíciles de clonar y habitualmente producen sólo rendimientos relativamente bajos de inmunoglobulina (James y Bell, *J. Immunol. Methods* 100: 5-40 [1987]). En el futuro, la inmortalización de células B humanas podría conseguirse posiblemente introduciendo una combinación definida de genes transformantes. Dicha posibilidad está destacada por la reciente demostración de que la expresión de la subunidad catalítica de telomerasa junto con la oncoproteína T grande de SV40 y un alelo oncogénico de H-ras daba como resultado la conversión tumorigénica de células epiteliales y de fibroblasto humanas normales (Hahn y et al., *Nature* 400: 464-468 [1999]).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir, tras inmunización, un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 [1993]; Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 [1995]; Fishwild et al., *Nat. Biotechnol.* 14: 845-851 [1996]; Mendez et al., *Nat. Genet.* 15: 146-156 [1997]; Green, J. *Immunol. Methods* 231: 11-23 [1999]; Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 [2000]; revisado en Little et al., *Immunol. Today* 21: 364-370 [2000]). Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la completa inhibición de la producción endógena de anticuerpo (Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555 [1993]). La transferencia del conjunto génico de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno (Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 [1993]).

Mendez et al. (*Nature Genetics* 15: 146-156 [1997]) han generado una línea de ratones transgénicos designada como "XenoMouse® II" que, cuando se exponen a un antígeno, generan anticuerpos completamente humanos de alta afinidad. Esto se consiguió mediante la integración en línea germinal de una megabase de loci de cadena pesada y cadena ligera humana en ratones con delección en el segmento J_H endógeno tal como se describe anteriormente. El XenoMouse® II alberga 1.020 kb de locus de cadena pesada humana que contienen aproximadamente 66 genes V_H , regiones D_H y J_H completas y tres regiones constantes diferentes (μ , δ y γ), y alberga también 800 kb de locus κ humanos que contienen 32 genes V_k , segmentos J_k y genes C_k . Los anticuerpos producidos en estos ratones se parecen mucho a los observados en ratones en todos los aspectos, incluyendo la transposición, ensamblaje y repertorio génicos. Los anticuerpos humanos se expresan preferiblemente frente a los anticuerpos endógenos debido a la delección en el segmento J_H endógeno, que evita la transposición génica en el locus murino.

Tomizuka et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 [2000]) han descrito recientemente la generación de un ratón transcormosómico (Tc) doble mediante la introducción de dos fragmentos de cromosomas humanos individuales (hCF), uno conteniendo el locus de cadena pesada de Ig completo (IgH , ~1,5 Mb) y el otro el locus de cadena ligera κ completo (Igk , ~2 Mb) en una cepa de ratón cuyos locis de IgG e Igk endógenos se inactivaron. Estos ratones montaron una respuesta de anticuerpo humano específica de antígeno en ausencia de anticuerpos de ratón. La tecnología Tc puede permitir la humanización de grupos de loci o genes complejos de un tamaño superior a megabases (tales como los que codifican receptores de células T, complejo mayor de histocompatibilidad, clúster P450, etc) en ratones u otros animales. Otra ventaja del método es la eliminación de la necesidad de clonación de loci grandes. Esta es una ventaja significativa dado que la clonación de fragmentos de ADN de tamaño superior a megabases que comprenden loci de Ig completos difíciles incluso con la utilización de cromosomas artificiales de levadura (Peterson et al., *Trends Genet.* 13: 61-66 [1997]; Jakobovits, *Curr. Biol.* 4: 761-763 [1994]). Además, se sabe que la región constante del locus de IgG humano contiene secuencias difíciles de clonar (Kang y Cox, *Genomics* 35: 189-195 [1996]).

Alternativamente, la tecnología de expresión en fagos se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 [1990]; revisada en Kipriyanov y Little, *Mol. Biotechnol.* 12: 173-201 [1999]; Hoogenboom y Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 [2000]). Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una cadena del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en varios formatos (revisado en Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 [1993]; Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 [1994]; Dall'Acqua y Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450 [1998]; Hoogenboom y Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 [2000]). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fagos. Clackson et al., (*Nature* 352: 624-628 [1991]) aislaron un grupo diverso de anticuerpos anti-oxazolona de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes de V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes de V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un grupo diverso de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), o Griffiths et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones en un alto grado (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad y se replican y diferencian preferencialmente las células B que expresan inmunoglobulinas en la superficie con afinidad elevada durante la posterior estimulación de antígenos. Este proceso natural se puede mimetizar mediante la utilización de la técnica conocida como "barajado de cadenas" (Marks et al., *Bio/Technol.* 10: 779-783 [1992]). En este método, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por la expresión en fagos se puede mejorar mediante la sustitución secuencial de los genes de la región V de cadena pesada y ligera con repertorios de variantes (repertorios) naturales de genes de dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de nM. Se ha descrito por Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993) una

estrategia para producir repertorios muy amplios de anticuerpos en fagos (también conocidos como “la madre de todas las bibliotecas”) y el aislamiento de un anticuerpo humano de afinidad elevado directamente de dicha biblioteca de fagos amplia ha sido descrito por Griffiths et al., *EMBO J.* 13: 3245-3260 (1994). El barajado de genes también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidad y especificidades similares al anticuerpo roedor de partida. Según este método, que también se refiere como “imprinting de epítipo”, el gen del dominio V de cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedores obtenidos por la técnica de expresión en fagos se sustituye por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras roedor-humano. La selección en antígeno da lugar al aislamiento de variable humana capaz de restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo gobierna (“imprints”) la elección del compañero. Cuando se repite el proceso a efectos de sustituir el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la solicitud de patente PCT WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedores mediante el injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de armazón o CDR de origen roedor.

(v) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un IFN- α para proporcionar un anticuerpo neutralizante, la otra es para cualquier otro antígeno.

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En la publicación de la solicitud PCT No. WO 93/08829 (publicada el 13 de mayo de 1993) y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

Según una estrategia diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera esté presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen o presentan una significancia particular. En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones no deseadas de cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación.

Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

(vi) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [publicación de solicitud PCT WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089]. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar utilizando procedimientos de reticulación convenientes. Los agentes de reticulación adecuados son conocidos en la técnica y se describen en la patente de Estados Unidos No. 4.676.980, junto con un conjunto de técnicas de reticulación.

(vii) Fragmentos de anticuerpos

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-IFN- α neutralizante (incluyendo anticuerpos murino, humano y humanizado, y variantes de anticuerpos) es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 [1992] y Brennan et al., Science 229:81 [1985]). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente por células huésped recombinantes (revisado en Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 [1999]; Little et al., Immunol. Today 21: 364-370 [2000]). Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 [1992]). En otra realización, el F(ab')₂ se forma utilizando la cremallera de leucinas GCN4 para inducir el ensamblaje de la molécula de F(ab')₂. Según otra estrategia, los fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico en la materia.

(viii) Variantes de anticuerpos en la secuencia de aminoácidos

Se contemplan la modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-IFN- α descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-IFN- α se preparan mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico que codifica las cadenas de anticuerpos anti-IFN- α , o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-IFN- α . Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos después de la traducción del anticuerpo anti-IFN- α , tal como un cambio en el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo anti-IFN- α neutralizante que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de rastreo de alanina", descrito por Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos dianas (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. A continuación, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional en las sustituciones se refinan mediante la introducción de más u otras variantes en, para, los sitios de sustitución. De este modo, aunque está predeterminado el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación per se no necesita ser predeterminada. Por ejemplo para analizar la acción de una mutación en un sitio determinado, se realiza una mutagénesis de rastreo de alanina o aleatoria en el codón o región diana y se criban las variantes del anticuerpo anti-IFN- α expresado para la actividad deseada.

Las inserciones en las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones terminales amino y/o carboxilo que varían en la longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencias de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo neutralizante anti-IFN- α con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un epítipo etiqueta. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo anti-IFN- α incluyen la fusión al N-terminal o C-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que incrementa la vida media en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo neutralizante anti-IFN- α eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. La mutagénesis por sustitución se puede realizar en las regiones FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 1, o tal como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y se pueden cribar los productos.

Tabla 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Substituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (U)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp

Gly(G)	Ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro(P)	Ala	ala
Ser(S)	Thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

También se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo anti-IFN- α neutralizante, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. En cambio, se puede añadir un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de modo monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetados en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, actividad antagonista) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el TNF- α . Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para un desarrollo posterior.

(ix) Variantes por glicosilación

Los anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, Chem. Immunol. 65:111-128 [1997]; Wright y Morrison, TibTECH 15:26-32 [1997]). Las cadenas laterales del oligosacárido de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318 [1996]; Wittwe y Howard, Biochem. 29:4175-4180 [1990]) y la interacción intramolecular entre partes de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Jefferis y Lund, supra; Wyss y Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416 [1996]). Los oligosacáridos también pueden servir para elegir como diana una glicoproteína dada para ciertas moléculas basadas en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha descrito que en IgG agalactosilada, el grupo de oligosacárido 'salta' del espacio inter-CH2 y los residuos de N-acetilglucosamina del extremo están disponibles para unirse a proteína de unión a manosa (Malhotra et al., Nature Med. 1:237-243 [1995]). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo

IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producidos en células de ovario de hámster chino (CHO) produjo una reducción completa en la lisis mediada por complemento (CMCL) (Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318 [1996]), mientras que la eliminación selectiva de residuos de ácido siálico usando neuraminidasa no dio lugar a la pérdida de DMCL. También se ha descrito que la glicosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se describió que las células CHO con expresión regulada con tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glicosiltransferasa de GlcNAc bisecante, tenían actividad ADCC mejorada (Umana et al., Mature Biotech. 17:176-180 [1999]).

La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Las variantes por glicosilación de anticuerpos son variantes en que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Mediante la alteración se entiende la eliminación de uno o más grupos carbohidrato ahllados en el anticuerpo, la adición de uno o más grupos carbohidrato al anticuerpo, el cambio de la composición de glicosilación (patrón de glicosilación), el grado de glicosilación, etc.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O). De manera similar, la eliminación de sitios de glicosilación se puede realizar mediante la alteración de aminoácidos en los sitios de glicosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera normalmente alterando la secuencia de ácidos nucleicos subyacente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-IFN- α se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a los mismos, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada (o dirigir al sitio) con oligonucleótidos, mutagénesis PCR, y mutagénesis de cassette de una versión variante o no variante preparada previamente del anticuerpo anti- IFN- α .

La glicosilación (incluyendo patrón de glicosilación) de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende ampliamente de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado a que el tipo de célula usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como posibles agentes terapéuticos, es raramente la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo Hse et al., J. Biol. Chem. 272:9062-9070 [1997]). Además de la elección de células huésped, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular que incluyen introducir o sobreexpresar ciertas enzimas que participan en la producción de oligosacáridos (patente de EE.UU. nº 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, pueden eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede manipularse genéticamente, por ejemplo, hacer defectuoso el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y similares son muy conocidas en la técnica.

La estructura de glicosilación de anticuerpos puede analizarse fácilmente por técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono que incluyen cromatografía de lectina, RMN, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis composicional de monosacáridos, digestión enzimática secuencial y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado para separar oligosacáridos basándose en la carga. También se conocen procedimientos para liberar los oligosacáridos para fines analíticos e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (realizado comúnmente usando péptido-N-glicosidasa F/endo- β -galactosidasa), eliminación usando medio alcalino agresivo para liberar principalmente estructuras ligadas por O, y procedimientos químicos usando hidracina anhidra para liberar tanto oligosacáridos ligados por N como por O.

(x) Otras modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos anti-IFN- α neutralizantes aquí descritos también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe

en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); y las patentes de Estados Unidos. Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la patente de Estados Unidos No. 5,013,556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de puentes disulfuro. Opcionalmente un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) está contenido en el liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

El anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activante de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO81/01145) en un fármaco activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y patente de Estados Unidos No. 4,975,278.

El componente enzima del inmunconjugado útil para la ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma más activa mostrando las propiedades biológicas deseadas.

Enzimas que son útiles en el procedimiento de esta invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con beta-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para convertir los profármacos en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describen en este documento para administrar la abzima a una población de células deseadas.

Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos anti-IFN- α neutralizantes mediante técnicas muy conocidas en el sector tales como el uso de reactivos de reticulación heterobifuncional descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención pueden construirse usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984)).

En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo a efectos de incrementar su vida media en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, mediante la mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en un péptido etiqueta que se fusiona a continuación al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, por ejemplo, mediante la síntesis de ADN o péptidos). Véase WO96/32478 publicada el 17 de octubre de 1996.

El epítipo de unión a receptor de rescate se constituye en general de una región en la que uno o más residuos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferiblemente, se transfieren tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Incluso más preferiblemente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3, o VH, o más de una de dichas regiones, del anticuerpo. Alternativamente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o la región VL, o ambas, del fragmento de anticuerpo.

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-IFN- α neutralizantes también se incluyen en el alcance de la invención. Se pueden realizar mediante síntesis química o mediante separación enzimática o química del anticuerpo. Si es aplicable, se introducen otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula mediante la reacción de los residuos de aminoácidos reconocidos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C-terminales. Ejemplos de modificaciones covalentes de polipéptidos se describen en la Patente de Estados Unidos 5,534,615. Un tipo preferido de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxiálquilenos, de la manera

establecida en las patentes de Estados Unidos 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

2. Cribado de anticuerpos con las propiedades deseadas

- 5 Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito anteriormente. Los anticuerpos anti-IFN- α con las propiedades neutralizantes de rango amplio deseadas se pueden entonces identificar mediante métodos conocidos por la técnica.

(i) *Ensayos de unión*

- 10 De este modo, por ejemplo, se pueden identificar anticuerpos anti-IFN- α neutralizantes en ensayos de unión a IFN- α , mediante la incubación de un anticuerpo candidato con uno o más subtipos de IFN- α individuales, o un grupo o mezcla de diversos subtipos de IFN- α , y la monitorización de la unión y la neutralización de una actividad biológica de IFN- α . El ensayo de unión se puede realizar con un polipéptido o polipéptidos de IFN- α purificados. El ensayo de
15 unión puede ser un ensayo de unión competitiva, donde se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato de competir con un anticuerpo anti-IFN- α conocido por la unión a IFN- α . El ensayo se puede realizar en varios formatos, incluyendo el formato ELISA, también mostrado en los ejemplos siguientes. La unión a IFN- α de un anticuerpo candidato también se puede monitorizar en un ensayo Biosensor BIAcore™, tal como se describe a continuación.

- 20 Se puede utilizar cualquier ensayo de unión de competición adecuado conocido en la técnica para caracterizar la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α candidato de competir con el anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano murino 9F3 por la unión a una especie de IFN- α particular. En *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) se describe un ensayo de competición de rutina. En otra
25 realización, el ensayo ELISA de unión a IFN- α descrito en el ejemplo 2 siguiente se podía modificar para utilizar la competición de unión a IFN- α entre un anticuerpo candidato y el anticuerpo 9F3. Dicho ensayo se podía realizar mediante la disposición en capas del IFN- α sobre placas de microtitulación, la incubación de las placas con capas con diluciones en serie de anticuerpo anti-IFN- α no marcado o anticuerpo de control no marcado mezclado con una concentración seleccionada de anticuerpo 9F3 marcado, la detección y medición de la señal del marcador del anticuerpo 9F3 y a continuación la comparación de las mediciones de señal mostradas por las diversas diluciones de
30 anticuerpo

(ii) *Ensayos antivirales*

- 35 La capacidad de un anticuerpo candidato de neutralizar una actividad biológica de IFN- α se puede llevar a cabo, por ejemplo, monitorizando la neutralización de la actividad antiviral de IFN- α tal como se ha descrito por Kawade, J. *Interferon Res.* 1:61-70 (1980), o Kawade y Watanabe, J. *Interferon Res.* 4:571-584 (1984). Brevemente, se añade una concentración fijada de IFN- α premezclada con varias diluciones de un anticuerpo candidato a células FL derivadas de amnio humano y se determina la capacidad del anticuerpo de neutralizar la actividad antiviral de IFN- α utilizando un virus apropiado, por ejemplo, virus Sindbis. Los títulos se expresan en unidades internacionales (IU),
40 determinados con el IFN- α humano de referencia internacional (NIH Ga23-901-527).

- El anticuerpo anti-IFN- α candidato se considera capaz de inhibir la actividad anti-viral de un subtipo de IFN- α seleccionado si una cierta concentración del anticuerpo inhibe más actividad anti-viral que el nivel de la línea base de la inhibición de actividad anti-viral medida en presencia de una concentración equivalente de anticuerpo control.
45 Opcionalmente, la cierta concentración del anticuerpo anti-IFN- α candidato inhibirá por lo menos o aproximadamente 60%, o por lo menos o aproximadamente 70%, preferiblemente por lo menos o aproximadamente 75%, o más preferiblemente por lo menos o aproximadamente 80%, o incluso más preferiblemente por lo menos o aproximadamente 85%, o incluso más preferiblemente por lo menos o aproximadamente 90%, o incluso más preferiblemente por lo menos o aproximadamente 95%, o lo más preferiblemente por lo menos o aproximadamente
50 99% de la actividad antiviral del subtipo de IFN- α seleccionado en el ensayo de actividad anti-viral en comparación con la actividad de la línea base medida en presencia de una concentración equivalente de anticuerpo de control. El anticuerpo anti-IFN- α candidato se considera incapaz de inhibir la actividad antiviral de un subtipo de IFN- α seleccionado si no hay una concentración del anticuerpo que muestra más inhibición de la actividad antiviral que el nivel de la línea base de la inhibición de actividad antiviral mediada en presencia de una concentración equivalente de anticuerpo de control.
55

- Cada especie de interferón utilizado en el ensayo de infectividad viral se puede valorar hasta una concentración que proporcione el mismo nivel de inhibición de crecimiento viral que el inducido por un número preseleccionado de unidades de un patrón de IFN- α . Esta concentración sirve para proporcionar las unidades normalizadas de la
60 especie de interferón del sujeto. A efectos de valorar la capacidad de un anticuerpo anti-IFN- α de inhibir la actividad antiviral de varios subtipos de IFN- α , se determina la concentración efectiva (EC₅₀) de anticuerpo anti-IFN- α para inhibir el 50% de una actividad antiviral del subtipo de IFN- α particular (a la concentración valorada para proporcionar las unidades normalizadas de actividad) para cada subtipo de IFN- α a analizar.

- 65 El ensayo de neutralización de actividad antiviral se puede realizar tal como se describe en el ejemplo 1. Brevemente, se desarrollan las células A549 hasta una densidad de 5×10^5 células A549/pocillo en placas de

microtitulación de 96 pocillos. Se incuban diluciones en serie de anticuerpo anti-IFN- α candidato con 0,2 unidades/:1 de un subtipo de IFN- α seleccionado (normalizado a 0,2 unidades/:1 del IFN- α 2 humano recombinante estándar de referencia NIH) en un volumen total de 100:1 a 37EC durante una hora. A continuación, se añade una mezcla de incubación 100:1 en volumen de anticuerpo/interferón a 5×10^5 células A549 y 100:1 de medio de cultivo en un pocillo individual en la placa de microtitulación, produciendo una concentración final de IFN- α de 100 unidades/ml en cada pocillo. Las mezclas de cultivo celular resultantes se incuban durante 24 horas a 37EC. A continuación, las células se estimulan con 2×10^5 pfu de virus de encefalomiocarditis (EMC) y se incuban durante 24 horas adicionales a 37EC. Al final de la incubación, se determina la viabilidad celular mediante un examen visual por microscopio o tinción con violeta cristal. La concentración efectiva (EC50) de un anticuerpo IFN- α candidato para inhibir el 50% de una actividad antiviral del subtipo de IFN- α particular en el ensayo se determina para cada subtipo de IFN- α a analizar.

(iii) Ensayos de bloqueo cruzado

Para cribar anticuerpos que se unen a un epítipo en IFN- α unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, o adicionalmente, se puede realizar la localización del epítipo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el epítipo de IFN- α unido por un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede determinar mediante un análisis de unión competitiva tal como se describe en Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550 -1558 (1990). En otro ejemplo, se pueden realizar estudios de bloqueo cruzado con fluorescencia directa en placas de microtitulación. En este método, el anticuerpo monoclonal de interés se conjuga con isotiocianato de fluoresceína (FIFC) utilizando procedimientos establecidos (Wofsy et al. *Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel y Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). El IFN- α seleccionado se coloca en capas sobre los pocillos de las placas de microtitulación, los pocillos con capas se incuban con mezclas de (1) anticuerpo monoclonal de interés marcado con FITC y (2) anticuerpo monoclonal de prueba no marcado, y se cuantifica la fluorescencia en cada pocillo para determinar el nivel de bloqueo cruzado mostrado por los anticuerpos. Se considera que los anticuerpos monoclonales comparten un epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50% o superior en comparación con un anticuerpo monoclonal irrelevante de control.

Los resultados obtenidos en los ensayos biológicos basados en células se pueden seguir por tanto mediante los análisis en modelos animales, por ejemplo murinos, y pruebas clínicas humanas. Si se desea, los anticuerpos monoclonales murinos identificados por tener las propiedades deseadas se pueden convertir en anticuerpos quiméricos o humanizados mediante técnicas conocidas en el sector, incluyendo la estrategia de "mutagénesis de conversión de genes", tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5,821,337. La humanización de un anticuerpo anti-IFN- α particular de la presente invención también se describe en los siguientes ejemplos.

(iv) Métodos de expresión en fagos

Se pueden identificar anticuerpos anti-IFN- α mediante la utilización de bibliotecas combinatorias para cribar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen fagos que expresan varios fragmentos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, etc.) de región variable de anticuerpo (Fv) fusionada a la proteína de recubrimiento del fago. Dichas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y de este modo se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. A continuación, los clones de unión se eluyen del antígeno y se pueden enriquecer posteriormente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Se pueden obtener anticuerpos anti-IFN- α mediante el diseño de un procedimiento de cribado de antígenos adecuados para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-IFN- α de longitud completa utilizando las secuencias Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat et al. (1991), supra.

Construcción de bibliotecas de expresión en fagos

El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo está formado de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentes ambas en tres bucles hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en los fagos, por ejemplo, como fragmentos de una sola cadena Fv (scFv), en los que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto y flexible; o como fragmentos F(ab')₂ en los que están fusionados a un dominio constante e interaccionan no covalentemente, tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Tal como se utiliza aquí, los clones de fagos que codifican scFc y clones de fagos que codifican Fab o F(ab')₂ se refieren globalmente como "clones de fagos de Fv" o "clones de Fv".

El repertorio de anticuerpos desnudos de un animal (el repertorio antes del estímulo antigénico) proporciona anticuerpos que pueden unirse con afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹) a esencialmente cualquier molécula ajena. La diversidad de secuencias de sitios de unión de anticuerpos no está codificada directamente por la línea germinal, sino que se reordena de forma combinatoria a partir de segmentos génicos V. En

5 cadenas pesadas humanas, los primeros dos bucles hipervariables (H1 y H2) se extraen de menos de 50 segmentos génicos VH, que se combinan con segmentos D y segmentos JH para crear el tercer bucle hipervariable (H3). En cadenas ligeras humanas, los primeros dos bucles hipervariables (L1 y L2) y mucho del tercero (L3) se extraen de menos de 30 segmentos V8 y menos de aproximadamente 30 segmentos V6 para completar el tercer bucle hipervariable (L3)

10 Cada reordenación combinatoria de segmentos génicos V en células madre ocasiona una célula B que expresa una combinación única VH-VL. Las inmunizaciones provocan que cualquier célula B que produzca una combinación se una al inmunógeno para que prolifere (expansión clonal) y secrete el anticuerpo correspondiente. Estos anticuerpos desnudos maduran a continuación hasta alcanzar una elevada afinidad (K_d^{-1} de 10^9 – 10^{10} M⁻¹) mediante un proceso de mutagénesis y selección conocido por maduración de la afinidad. Es a partir de dicho momento que las células se extraen para preparar hibridomas y generar anticuerpos monoclonales de elevada afinidad.

15 En las tres etapas de este proceso, los repertorios de genes VH y VL pueden clonarse separadamente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que a continuación se buscan por clones de unión al antígeno tal como se describió por Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de afinidad elevada al inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio de anticuerpos desnudos puede clonarse para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos en un intervalo amplio de antígenos no propios y también de propios sin inmunización tal como se describió por Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Por último, las bibliotecas originales también pueden generarse sintéticamente mediante clonación de los segmentos del gen V o VIII no reordenados de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contengan una secuencia aleatoria que codifique las regiones CDR3 altamente variables y lograr así reordenamientos *in vitro* tal como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

25 La expresión en fagos simula la expresión en células B. Los fagos filamentosos se utilizan para expresar fragmentos de anticuerpos mediante fusión con la proteína de la cubierta pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden expresarse como fragmentos Fv de una sola cadena, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, tal como se describe por Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); o como fragmentos Fab (incluyendo fragmentos F(ab')₂), en los que se fusiona una cadena con pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde el ensamblamiento de una estructura Fab-proteína de la cubierta se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la cubierta de tipo salvaje, por ejemplo, tal como se describe en Hoogenboom et al., Nucl. Acids. Res., 19:4133-4137 (1991). Cuando los fragmentos de anticuerpo se fusionan con el extremo N-terminal de pIII, el fago es infeccioso. Sin embargo, si el dominio N-terminal de pIII se escinde y las fusiones se realizan con el segundo dominio, el fago no es infeccioso y pIII de tipo salvaje debe ser proporcionada por el fago auxiliar.

40 La fusión de pIII y de otras proteínas del fago pueden codificarse totalmente dentro del mismo replicón del fago, o en replicones distintos. Cuando se utilizan dos replicones, la fusión de pIII se codifica en un fagémido, un plásmido que contiene un origen de replicación de fago. Los fagémidos pueden empaquetarse en partículas mediante rescate con un fago auxiliar tal como el M13K07 que proporciona todas las proteínas del fago, incluyendo el pIII, pero debido a un origen defectuoso él mismo se empaqueta mal en competición con los fagémidos, tal como se describe en Vieira y Messing, Meth. Enzymol., 153:3-11 (1987). En un procedimiento preferido, el sistema de expresión en fagos se diseña de forma que el fago recombinante pueda crecer en células huésped en condiciones tales que se permita que una cantidad pequeña de partículas fágicas expresen más de una copia de la fusión Fv-proteína de la cubierta en la superficie de la partícula, tal como se describe en Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990) y en WO 92/09690, (PCT/US91/09133, publicada el 11 de junio de 1992).

50 En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunes recogidas de humanos o animales. Si se desea una biblioteca predispuesta a favor de clones de anti-IFN- α , el sujeto se inmuniza con IFN- α para generar una respuesta de anticuerpo, y se recuperan las células de bazo y/o células B circulantes o de otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de bibliotecas. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano predispuesta a favor de clones anti-IFN- α humanos mediante la generación de una respuesta de anticuerpo anti-IFN- α humano en ratones transgénicos que portan un grupo de genes de inmunoglobulinas humanas funcionales (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de manera que la inmunización de IFN- α produce células B que producen anticuerpos de secuencia humana contra IFN- α .

60 Los animales se pueden inmunizar con una mezcla de varios, preferiblemente todos, subtipos de IFN- α a efectos de generar una respuesta de anticuerpo que incluye células B que producen anticuerpos anti-IFN- α con una amplia reactividad contra subtipos de IFN- α . Los animales se pueden inmunizar con la mezcla de subtipos de IFN- α humano que están presentes en los interferones linfoblastoides humanos secretados por células de linfoma de Burkitt (células Namalva) inducidas por virus Sensadi, tal como se describe en el ejemplo 1. Una preparación adecuada de dichos interferones linfoblastoides humanos se pueden obtener comercialmente (Producto No. I-9887) de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

El enriquecimiento adicional de poblaciones de células reactivas a anti-IFN- α se puede obtener utilizando un procedimiento de cribado adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específica de IFN- α , por ejemplo, mediante la separación celular con cromatografía de afinidad a IFN- α o adsorción de células a IFN- α marcado con fluorocromo seguido de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Alternativamente, la utilización de células de bazo y/o células B u otras PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humano y no humano), en que el IFN- α no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan una construcción génica de anticuerpos *in vitro*, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpo no reordenados. Las células inmunes de interés se pueden obtener de una variedad de especies animales, tales como humano, ratón, rata, lagomorfos, lupinos, caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos, y especies aviares, etc.

El ácido nucleico que codifica segmentos de genes variables de anticuerpos (incluyendo segmentos VH y VL) se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reordenadas, el ADN deseado puede obtenerse mediante aislamiento de ADN genómico o del mRNA de linfocitos seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se hibridan con los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reordenados, tal como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), produciendo así diversos repertorios de genes de V para la expresión. Los genes de V pueden amplificarse a partir del cADN y de ADN genómico, con cebadores de sentido 3' de transcripción en el extremo 5' del exón codificante del dominio V maduro y cebadores de sentido 5' de transcripción basados en el segmento J, tal como se describe en Orlandi et al. (1989) y en Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del cADN, los cebadores de sentido 3' de transcripción también pueden basarse en el exón líder tal como se describe en Jones et al., Biotechnol. 9:88-89 (1991), y los cebadores de sentido 5' de transcripción en la región constante tal como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores tal como se describe en Orlandi et al., (1989), o Sastry et al., (1989). Preferiblemente, se maximiza la diversidad de bibliotecas mediante cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes de V con el fin de amplificar todos los reordenamientos de VH y VL disponibles en la muestra de ácido nucleico de la célula inmune, por ejemplo, tal como se describe en el procedimiento de Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), o como se describe en el procedimiento de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducirse dianas de restricción raras dentro de los cebadores de PCR como una etiqueta en un extremo, tal como se describe en Orlandi et al., (1989), o mediante amplificación por PCR posterior con un cebador etiquetado tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos de genes de V. La mayoría de segmentos de genes de VH se han clonado y secuenciado (publicado por Tomlinson et al., J.Mol. Biol., 227:776-798 (1992)) y se han localizado (publicado en Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones importantes del bucle H1 y H2) pueden utilizarse para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencias y longitudes varias, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden generarse con toda la diversidad de secuencia focalizada en un bucle de H3 largo de una sola longitud, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). Los segmentos V6 y V8 humanos se han clonado y secuencia (publicado por Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993) y se pueden utilizar para producir repertorios sintéticos de cadena ligera. Los repertorios de genes de V, en base a un intervalo de pliegues de VH y VL y de longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN codificantes de genes de V, se pueden reordenar segmentos de genes V de la línea germinal *in vitro* de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpo pueden construirse combinando repertorios de genes de VH y VL juntos de muy diversas maneras. Cada repertorio puede crearse en vectores distintos, y los vectores pueden combinarse *in vitro*, por ejemplo, tal como se describe en Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., Nucl. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993). La estrategia de la recombinación *in vivo* explota dos cadenas naturales de fragmentos Fab para sobrepasar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación en *E. coli*. Los repertorios de VH y VL de anticuerpos desnudos se clonan separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fagos. Las dos bibliotecas se combinan entonces mediante infección fágica de las bacterias que contienen el fagémido, de modo que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca se limita únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales recombinantes *in vivo*, de modo que los genes de VH y VL se recombinan en un único replicón y se co-empaquetan en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan un gran número de anticuerpos diversos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, tal como se

describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos mediante PCR y luego clonarse, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). El ensamblaje de PCR puede también utilizarse para unir ADN de VH y VL con el ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de una sola cadena (scFv). En otras técnicas, "el ensamblamiento por PCR en la célula" se utiliza para combinar los genes de VH y VL en los linfocitos mediante PCR y luego clonar los repertorios de los genes unidos, tal como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids. Res. 20:3831-3837 (1992).

Los anticuerpos desnudos producidos por bibliotecas (naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada (kd^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7M^{-1}), pero la maduración de la afinidad puede también ser también simulada *in vitro* mediante construcción y reselección de bibliotecas secundarias, tal como se describe en Winter et al., (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación puede introducirse aleatoriamente *in vitro* utilizando una polimerasa propensa a errores (publicada en Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración de la afinidad puede realizarse mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, utilizando la PCR con cebadores que contienen una secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y el cribado para clones de mayor afinidad. El documento WO 96/07754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un procedimiento para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia efectiva es recombinar los dominios VH y VL seleccionados mediante expresión en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidos de donantes no inmunizados y el cribado para una mayor afinidad en diversas rondas de rebarajamiento de cadenas, tal como se describe en Marks col., Biotechnol., 10:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el rango de 10^9M .

Cribado de bibliotecas de expresión en fagos para clones anti-IFN- α

a. Síntesis de IFN- α

La secuencia de ácido nucleico que codifica los subtipos de IFN- α utilizados aquí se pueden diseñar utilizando las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos publicadas de interferones, por ejemplo. Véase la compilación de J. Interferon Res., 13: 443-444 (1993) de referencias que contienen secuencias de ADN genómico y ADNc para varios interferones de tipo I, y las referencias citadas en las mismas. Para las secuencias de aminoácidos y secuencias de ADNc de IFN- α A (IFN- α 2), IFN- α B (IFN- α 8), IFN- α C (IFN- α 10), IFN- α D (IFN- α 1), IFN- α E (IFN- α 22), IFN- α F (IFN- α 21), IFN- α G (IFN- α 5), e IFN- α H (IFN- α 14), véanse las figuras 3 y 4 en las páginas 23-24 de Goeddel et al., Nature, 290: 20-26 (1981). Para el ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de IFN- α 7 (IFN- α J), véase Cohen et al., Dev. Biol. Standard, 60: 111-122 (1985). Los ADN que codifican los interferones de interés se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, síntesis química por cualquiera de los métodos descritos en Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tales como métodos de triéster, fosfito, fosforamidita y H-fosfonato. En una realización, se utilizan codones preferidos por la célula huésped de expresión en el diseño del ADN que codifica los interferones. Alternativamente, el ADN que codifica el interferón se puede aislar de una biblioteca genómica o de ADNc.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el interferón de interés, la molécula de ADN se une operativamente a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, donde la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y control que derivan de especies compatibles con la célula huésped. El vector porta normalmente un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas.

Para la expresión en huéspedes procariotas, los vectores apropiados incluyen el pBR322 (ATCC N° 37.017), phGH107 (ATCC N° 40.011), pBO475, pS0132, pRIT5, cualquier vector en la serie pRIT20 o pRIT30 (Nilsson y Abrahmsen, Meth. Enzymol., 185:144-161 (1990)), pRIT2T, pKK233-2, pDR540 y pPL-lambda. Las células huésped procariotas que contienen los vectores de expresión adecuados para utilizar aquí incluyen la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC N° 31.446), la cepa JM101 de *E. coli* (Messing et al., Nucl. Acid Res., 9:309 (1981)), la cepa B de *E. coli*, la cepa Π 1776 de *E. coli* (ATCC N° 31537), *E. coli* c600 (Appleyard, Genetics, 39: 440 (1954)), *E. coli* W3110 (F-, gamma-, prototrófica; ATCC N° 27.325), la cepa 27C7 de *E. coli* (W3110, tonA, phoA E15, (argF-lac)169, ptr3, degP41, ompT, kanr) (Patente Estadounidense N° 5.288.931, ATCC N° 55.244), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcesans*, y especies de *Pseudomonas*.

Además de los procariotas, los organismos eucariotas, tales como las levaduras, o las células derivadas de organismos multicelulares pueden usarse como células huéspedes. Para la expresión en células huésped de levadura, tales como la levadura común de panadería o *Saccharomyces cerevisiae*, los vectores apropiados incluyen los vectores que se replican episomalmente basados en el plásmido de 2-micrómetros, los vectores de integración, y los vectores de cromosoma artificial de levadura (YAC). Para la expresión en células huéspedes de insecto, tales como las células Sf9, los vectores apropiados incluyen los vectores baculovíricos. Para la expresión en células huésped de plantas, particularmente huéspedes de plantas dicotiledóneas, tales como el tabaco, los vectores de

expresión apropiados incluyen los vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Sin embargo, ha habido un mayor interés en células huésped de vertebrados. Los ejemplos de células huéspedes de mamífero útiles incluyen la línea CV1 renal de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea renal embrionaria humana (células 293 ó 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); células de rincón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); las células ováricas de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); las células de Sertoli del ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); las células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); las células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); las células del carcinoma del cuello de útero humanas (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de ratas Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea celular de hepatoma humano (Hep G2). Para la expresión en células huéspedes de mamífero, los vectores útiles incluyen los vectores derivados del SV40, los vectores derivados de citomegalovirus, tales como los vectores pRK, incluyendo el pRK5 y el pRK7 (Suva *et al.*, *Science*, 237:893-896 (1987); EP-307.247 (3/15/89), EP 278.776 (8/17/88)), los vectores derivados del virus vaccinia u otros virus de viruela, y vectores retrovirales tales como los vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV).

Opcionalmente, el ADN que codifica el interferón de interés está unido operativamente a una secuencia líder de la secreción, lo que resulta en la secreción del producto de expresión por parte de la célula huésped en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder de secreción incluyen las de STII, ecotín, lamB, GD de herpes, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa, y factor alfa. Es también apropiada para su uso en la presente invención la secuencia líder de 36 aminoácidos de la Proteína A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4:3901 (1985)).

Las células huéspedes se transfectan y preferiblemente transforman con los vectores de expresión o clonación de esta invención descritos más arriba, y se cultivan en medios nutritivos convencionales, modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por parte de una célula huésped, sin importar si de hecho se expresa alguna secuencia codificante. Hay numerosos procedimientos de transfección conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y la electroporación. La transfección satisfactoria generalmente se reconoce cuando tiene lugar alguna indicación de la operación de este vector dentro de la célula huésped.

Transformación significa introducir ADN en un organismo de tal forma que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándares apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), se usan generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras sustanciales de pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describen Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin tales paredes celulares, se prefiere el método de precipitación con fosfato de calcio descrito en las secciones 16.30-16.37 de Sambrook *et al.*, *supra*. Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huéspedes de células de mamífero se han descrito por Axel en la patente estadounidense n° 4.399.216 concedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo habitualmente de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también podrían usarse otros procedimientos para introducir el ADN en las células, tales como mediante la inyección nuclear, la electroporación o mediante la fusión con protoplastos.

Las células huésped procariotas utilizadas para producir el interferón de interés se puede cultivar tal como se ha descrito en general en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las células huésped de mamífero utilizadas para producir el interferón de interés pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios en Ham y Wallace, *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes y Sato, *Anal. Biochem.*, 102: 255 (1980), U.S. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; o 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195; Patente de Estados Unidos Re. 30,985; o U.S. 5,122,469, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia, se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según resulte necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GentamycinTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos

habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente energética equivalente. También pueden incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que resultarán conocidas para el experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquéllas utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para el experto ordinario en la materia.

Las células huésped referidas en esta memoria comprenden células en un cultivo in vitro, así como células que están en un animal huésped.

En un sistema de expresión intracelular o sistema de secreción al espacio periplásmico, la proteína interferón expresada recombinantemente se puede recuperar de las células del cultivo mediante la alteración de la pared celular/membrana de la célula huésped (por ejemplo, mediante choque osmótico o solubilización de la membrana de la célula huésped en detergente). Alternativamente, en un sistema de secreción extracelular, la proteína recombinante se puede recuperar del medio de cultivo. Como primera etapa, el medio de cultivo o lisado se centrifuga para eliminar cualquier residuo celular particulado. Las fracciones de proteína solubles y membrana se separan a continuación. Normalmente, el interferón se purifica de la fracción de proteína soluble. Si el IFN- α se expresa como una especie unida a membrana, el péptido unido a membrana se puede recuperar de la fracción de membrana mediante la solubilización con detergentes. El extracto crudo de péptido se puede purificar posteriormente mediante procedimientos adecuados, tales como el fraccionamiento en columnas de inunoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "chromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidad hidrofóbica y afinidad de ligando utilizando receptor de interferón inmovilizado en una matriz.

Muchos de los IFN- α humanos utilizados aquí se pueden obtener de fuentes comerciales, por ejemplo, de Sigma (St. Louis, MO), Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA) o ACCURATE Chemical & Scientific Corporation (Westbury, NY).

Se utilizan los procedimientos de clonación estándar descritos en Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) para construir plásmidos que dirigen la translocación de las diversas especies de hIFN- α en el espacio periplásmico de *E. coli*. Las reacciones PCR se realizan en clones de ADNc de las diversas subespecies de hIFN- α descritas en Goeddel et al., *Nature* 290: 20-26 (1981) con sitios de restricción NsiI y Styl añadidos a los cebadores. A continuación, estos productos PCR se subclonan en los correspondientes sitios del vector de expresión pB0720 descrito en Cunningham et al., *Science* 243:1330-1336 (1989). Los plásmidos resultantes colocan la producción de los subtipos de hIFN- α bajo el control del promotor phoA de *E. coli* y el péptido señal de enterotoxina II estable al calor tal como se describe en Chang et al., *Gene* 55: 189-196 (1987). La secuencia correcta de ADN de cada gen se confirma utilizando el kit United States Biochemical Sequenase version 2.0. Cada plásmido se transforma en la cepa 27C7 de *E. coli* (ATCC # 55244) y se deja crecer en fermentores de 10 litros tal como se describe en Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992).

Los hIFNs humanos se purifican de la pasta de *E. coli* que contienen cada IFN- α mediante cromatografía de afinidad. Se lisan las células bacterianas, y el lisado se centrifuga a 10,000 x g para eliminar los residuos. El sobrenadante se aplica a una columna de inunoafinidad que contiene un anticuerpo anti-hIFN- α B de ratón (LI-1) que se obtiene tal como se describe en Staehelin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:1848-1852 (1981). LI-1 se inmoviliza en el vidrio de poro controlado mediante una modificación del método de Roy et al., *Journal of Chromatography*, 303: 225-228 (1984).

El interferón unido se eluye de la columna con citrato 0,1 M, pH 3,0, que contiene glicerol al 20% (p/v). El IFN purificado se analiza mediante SDS-PAGE e inunotransferencia, y se analiza la bioactividad mediante el ensayo antiviral inducido por hIFN tal como se describe aquí.

La molécula híbrida humana IFN- α 2/1 (IFN- α 21-62/ α 64-166) se obtuvo tal como se describe en Rehberg et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 11497-11502 (1992) o Horisberger y Marco, *Pharmac. Ther.*, 66: 507-534 (1995).

b. Inmovilización de IFN- α

El IFN- α purificado se puede unir a una matriz adecuada, tal como partículas de agarosa, partículas de acrilamida, partículas de vidrio, celulosa, varios copolímeros acrílicos, geles de hidroxil metacrilado, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nylon, portadores neutrales e iónicos, y similares, para utilizar en la separación cromatográfica de afinidad de clones de expresión en fagos. La unión de la proteína de IFN- α a la matriz se puede realizar mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica utilizada habitualmente para unir ligandos de proteína a matrices de polisacáridos, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del portador con haluros de cianógeno y el posterior acoplamiento de aminos alifáticos primarios o aromáticos de ligando de péptido a la matriz activada.

Alternativamente, el IFN- α se puede utilizar para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresarse en

células huésped fijadas a las placas de adsorción o utilizarse en la clasificación celular, o conjugarse a biotina para la captura con partículas recubiertas con estreptavidina, o utilizarse en cualquier otro método conocido en el sector para cribar bibliotecas de expresión en fagos.

5 c. Procedimientos de cribado

Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con IFN- α inmovilizado bajo condiciones adecuadas para la unión de por lo menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, se seleccionan las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, temperatura y similar, para mimetizar las condiciones fisiológicas.

10 El fago unido a la fase sólida se lava y a continuación se eluye mediante ácido, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, tal como se describe en Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante IFN- α antígeno, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una única ronda de selección. Además, el fago enriquecido se puede desarrollar en cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.

Los fagos se pueden incubar en serie con varios tipos de subtipos de IFN- α inmovilizados a efectos de identificar y caracterizar posteriormente los clones de fagos que muestran una unión apreciable a una mayoría, preferiblemente todos, los subtipos de IFN- α . En este método, los fagos se incuban en primer lugar con un subtipo específico de IFN- α . Los fagos unidos a este subtipo se eluyen y se someten a la selección con otro subtipo de IFN- α . El proceso de unión y elución se repite de este modo con todos los subtipos de IFN- α . Al final, el procedimiento produce una población de fagos que expresan anticuerpos con una amplia reactividad contra todos los subtipos de IFN- α . Estos fagos se pueden entonces analizar contra otras especies de IFN, es decir diferente de IFN- α , a efectos de seleccionar los clones que no muestran una unión apreciable a otras especies de IFN. Finalmente, los clones de fagos seleccionados se pueden examinar por su capacidad de neutralizar la actividad biológica, por ejemplo, la actividad antiviral, de varios subtipos de IFN- α , y se seleccionan finalmente los clones que representan anticuerpos con una amplia actividad de neutralización contra una mayoría, preferiblemente todos, los subtipos de IFN- α .

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago se pueden unir simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con una cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden mantener mediante la utilización de lavados cortos, una expresión en fagos multivalentes y una densidad elevada de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la unión de nuevo del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con una cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede inducir mediante la utilización de lavados largos y la expresión en fagos monovalentes tal como se describe en Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en WO 92/09690, y una densidad de recubrimiento bajo de antígeno tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para IFN- α . Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, tal como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de afinidad descritas anteriormente) es probable que den lugar a muchas mutaciones, la mayoría de unión a antígeno, y pocas con una mayor afinidad. Con la limitación de IFN- α , los fagos raros de afinidad elevada se podrían quedar excluidos. Para mantener todos los mutantes de afinidad más elevada, los fagos se pueden incubar con un exceso de IFN- α biotinilado, pero con el IFN- α biotinilado a una concentración de molaridad inferior a la de la constante de afinidad molar diana para IFN- α . El fago de unión con afinidad elevada se puede capturar a continuación mediante partículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad superior de como mínimo dos veces de un gran exceso de fago con una afinidad menor. Las condiciones utilizadas en el lavado de fago unido a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en base a la disociación cinética.

Los fagos se pueden incubar en serie con varios subtipos de IFN- α inmovilizados en un soporte sólido, tal como partículas de una matriz polimérica cromatográfica descrita anteriormente. En este método, los fagos se incuban primero con un subtipo de IFN- α específico. Los fagos unidos a este subtipo se eluyen de la fase sólida con un eluyente adecuado, tal como cualquier tampón de sal o ácido capaz de liberar los fagos unidos en la solución. A continuación, los clones de fagos eluidos se someten a selección con otro subtipo de IFN- α . A efectos de enriquecer la población de clones que compite con el IFNAR2 soluble por la unión a IFN- α , se incuban los clones de fagos recuperados de la serie de separaciones cromatográficas del subtipo de IFN- α con un complejo de IFNAR2 inmovilizado preabsorbido a IFN- α , y los clones de fagos no adsorbidos se recuperan de la mezcla de reacción de incubación.

Los procedimientos de selección se pueden diseñar para utilizar cualquier técnica cromatográfica en discontinuo. En una realización, los clones de fagos se adsorben a partículas de matriz polimérica derivatizada con IFN- α en suspensión, las partículas adsorbidas se recuperan mediante centrifugación, las partículas recuperadas se resuspenden y se incuban en un tampón de elución adecuado, tal como cualquier tampón de sal o ácido capaz de

liberar los fagos unidos en solución, la mezcla de elución se centrifuga, los clones de fagos eluidos se recuperan del sobrenadante, y a continuación, se repite el procedimiento de adsorción/elución para cada subtipo de IFN- α adicional. A efectos de enriquecer la población de clones que compite con el IFNAR2 soluble por la unión a IFN- α , se incuban los clones de fagos recuperados de las separaciones cromatográficas del subtipo de IFN- α con una suspensión de partículas de matriz polimérica derivatizada con IFNAR-2 preadsorbidas a IFN- α , la mezcla de incubación se centrifuga y los clones de fagos no adsorbidos se recuperan del sobrenadante.

El procedimiento de selección se diseña para enriquecer la población de fagos por la propiedad de inhibir la unión de IFN- α a IFNAR2 durante cada una de las separaciones cromatográficas por afinidad. En este método, los fagos se incuban en serie con cada uno de los subtipos de IFN- α específicos inmovilizados en un soporte sólido y a continuación se eluyen de la fase sólida con un eluyente que comprende un exceso de IFNAR2 soluble, tal como ECD de IFNAR2-Fc de IgG, bajo condiciones en las que el IFNAR2 soluble es capaz de desplazar cualquier clon de fago que compite con IFNAR2 por la unión al IFN- α inmovilizado. El proceso de unión y elución se repite de este modo con cada uno de los subtipos de IFN- α específico.

Los clones de fagos se pueden adsorber a partículas de matriz polimérica derivatizada con IFN- α en suspensión, las partículas adsorbidas se recuperan mediante centrifugación, las partículas recuperadas se resuspenden y se incuban en un tampón de elución adecuado, que comprende un exceso de IFNAR2 soluble (tal como ECD de IFNAR2-Fc de IgG, bajo condiciones en las que el IFNAR2 soluble es capaz de desplazar cualquier clon de fago que compite con IFNAR2 por la unión al IFN- α inmovilizado y liberar los fagos unidos en solución, la mezcla de elución se centrifuga, los clones de fagos eluidos se recuperan del sobrenadante, y a continuación se repite el procedimiento de adsorción/elución para cada subtipo de IFN- α adicional.

Al final, el procedimiento produce una población de fagos que expresan anticuerpos con actividad de inhibición de la unión a IFNAR2 contra un amplio rango de subtipos de IFN- α . A continuación, se pueden analizar estos fagos contra otro tipo de IFN (diferente del tipo IFN- α), tal como IFN- β , a efectos de seleccionar aquellos clones que no muestran una unión apreciable a otros tipos de IFN. Finalmente, los clones de fagos seleccionados se pueden examinar por su capacidad de neutralizar la actividad biológica, por ejemplo, la actividad antiviral, de varios subtipos de IFN- α , y se seleccionan finalmente los clones que representan anticuerpos con una amplia actividad de neutralización contra una mayoría, preferiblemente todos, los subtipos de IFN- α .

Selección de actividad de clones anti-IFN- α

La presente invención proporciona anticuerpos anti-IFN- α que se unen, y neutralizan, la actividad de una mayoría, preferiblemente todos, los subtipos de IFN- α , pero no se unen significativamente o neutralizan la actividad de cualquier otro tipo de interferón. Por ejemplo, se puede analizar la capacidad de varios clones de fagos de neutralizar las actividades antivirales de varios subtipos de IFN- α , esencialmente de la misma manera que se ha descrito anteriormente para los anticuerpos.

4. Preparación de IFNAR2-IgG soluble

Se puede generar un ADNc que codifica las proteínas de fusión a inmunoglobulina humana (inmunoadhesinas) basadas en el dominio extracelular (ECD) del hIFNAR2 (clon hIFNAR2-IgG en pRK5) utilizando métodos similares a los descritos por Haak-Frendscho et al., Immunology 79: 594-599 (1993) para la construcción de una inmunoadhesina de receptor de IFN- α (murino). Brevemente, se construye el plásmido pRKCD42Fc1 tal como se describe en el ejemplo 4 de WO 89/02922 (PCT/US88/03414, publicada el 6 de abril de 1989). La secuencia codificante de ADNc para los primeros 216 residuos del ECD de hIFNAR2 maduro se obtiene de la secuencia publicada (Novick et al., Cell, 77: 391-400 [1994]). La secuencia codificante de CD4 en el pRKCD42Fc1 se sustituye por el ECD de hIFNAR2 que codifica el ADNc para formar el clon de hIFNAR2-IgG en pRK5. hIFNAR2-IgG se expresa en células 293 de riñón embrionario humano mediante la transfección transitoria utilizando una técnica de precipitación con fosfato de calcio. La inmunoadhesina se purifica a partir de sobrenadantes de cultivo celular libre de suero en una sola etapa mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-sepharosa tal como se describe en Haak-Frendscho et al. (1993), supra. El hIFNAR2-IgG unido se eluye con tampón citrato 0,1 M, pH 3,0, que contiene glicerol al 20% (p/v). El hIFNAR2-IgG purificado es más del 95% puro, según la SDS-PAGE.

5. Usos diagnósticos de anticuerpos anti-IFN- α

Los anticuerpos anti-IFN- α de la invención son reactivos únicos de investigación en los ensayos de diagnóstico para la expresión de IFN- α . Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión de IFN- α se incrementa en ciertas enfermedades autoinmunes, tales como IDDM, SLE, y tiroiditis autoinmune. La expresión incrementada de varios subtipos de IFN- α en dichos trastornos se puede detectar y cuantificar utilizando anticuerpos anti-IFN- α de la presente invención con una amplia reactividad contra una mayoría de subtipos de IFN- α . Los anticuerpos anti-IFN- α también son útiles para la purificación por afinidad de varios subtipos de IFN- α de cultivo de células recombinantes o fuentes naturales.

Los anticuerpos anti-IFN- α se pueden utilizar para la detección de IFN- α en cualquier de un conjunto de métodos de

diagnóstico conocidos. Por ejemplo, se puede analizar una muestra biológica por el IFN- α mediante la obtención de la muestra de una fuente deseada, la mezcla de la muestra con anticuerpo anti-IFN- α y dejando que el anticuerpo forme el complejo anticuerpo/IFN- α con cualquier subtipo de IFN- α presente en la mezcla, y la detección de cualquier complejo anticuerpo/IFN- α presente en la mezcla. La muestra biológica se puede preparar para el ensayo mediante métodos conocidos en el sector que son adecuados para la muestra concreta. Los métodos de mezclado de la muestra con los anticuerpos y los métodos de detección del complejo anticuerpo/IFN- α se eligen de acuerdo con el tipo de ensayo utilizado. Dichos ensayos incluyen ensayos competitivos y sándwich y ensayos de inhibición estérica. Los métodos competitivos y sándwich utilizan una etapa de separación de fases como parte integral del método, mientras que los ensayos de inhibición estérica se realizan en una única mezcla de reacción.

Los métodos analíticos para IFN- α utilizan todos uno o más de los siguientes reactivos: análogo de IFN- α marcado, análogo de IFN- α inmovilizado, anticuerpo anti-IFN- α marcado, anticuerpo anti-IFN- α inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos marcados también se conocen como "trazadores".

El marcador utilizado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de IFN- α y el anticuerpo anti-IFN- α . Se conocen numerosos marcadores para utilizar en inmunoensayos, algunos ejemplos incluyen grupos que se pueden detectar directamente, tal como marcadores fluorocromos, quimioluminiscentes y radioactivos, así como grupos, tales como enzimas, que deben reaccionar o derivatizarse para ser detectados. Ejemplos de dichos marcadores incluyen los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acoplada con una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Existen métodos convencionales disponibles para unir estos marcadores covalentemente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, se pueden utilizar agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, benzidina bis-diazotizada, y similares para etiquetar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 3,940,475 (fluorimetría) y 3,645,090 (enzimas); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferidos de la presente invención son enzimas, tales como la peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina.

La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, al anticuerpo es un procedimiento de manipulación estándar para un experto en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

La inmovilización de reactivos es necesaria para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización comprende separar el anticuerpo anti-IFN- α de cualquier IFN- α que permanezca libre en solución. Esto se consigue normalmente insolubilizando el anticuerpo anti-IFN- α o análogo de IFN- α antes del procedimiento de ensayo, como mediante la adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., U.S. 3,720,760), mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación con glutaraldehído), o mediante insolubilización del anticuerpo anti-IFN- α o análogo de IFN- α posterior, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o sándwich, están bien establecidos y se utilizan ampliamente en la industria comercial del diagnóstico.

Los ensayos competitivos dependen de la capacidad de un análogo de IFN- α trazador para competir con el IFN- α de muestra de análisis por un número limitado de sitios de unión a antígeno de anticuerpo anti-IFN- α . Normalmente se insolubiliza el anticuerpo anti-IFN- α antes o después de la competición y a continuación el trazador e IFN- α unidos al anticuerpo anti-IFN- α se separan del trazador sin unir e IFN- α . Esta separación se logra mediante decantación (en la que el compañero de unión se pre-insolubilizó) o mediante centrifugación (en la que se precipitó el compañero de unión después de la reacción competitiva). La cantidad de IFN- α de muestra de análisis es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido medida mediante la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan las curvas de dosis-respuesta con cantidades conocidas de IFN- α y se comparan con los resultados del análisis para determinar cuantitativamente la cantidad de IFN- α presente en la muestra de análisis. Estos análisis se denominan sistemas ELISA si se utilizan enzimas como marcadores detectables.

Otro tipo de ensayo competitivo, llamado ensayo "homogéneo", no requiere una separación de fases. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el IFN- α y se utiliza de modo que cuando el anticuerpo anti-IFN- α se une al IFN- α , la presencia del anticuerpo anti-IFN- α modifica la actividad enzimática. En este caso, se conjugan el IFN- α o sus fragmentos inmunológicamente activos con un puente orgánico bifuncional a una enzima, tal como la

peroxidasa. Se seleccionan conjugados para su uso con anticuerpo anti-IFN- α , de manera que esa unión del anticuerpo anti-IFN- α inhibe o potencia la actividad enzimática del marcador. Este procedimiento *per se* es ampliamente realizado bajo el nombre de EMIT.

Se utilizan conjugados estéricos en procedimientos de impedimento estérico para ensayo homogéneo. Estos conjugados se sintetizan mediante la unión covalente de un hapteno de bajo peso molecular con un fragmento pequeño de IFN- α de manera que el anticuerpo para hapteno es substancialmente incapaz de unirse al conjugado a la vez que el anticuerpo anti-IFN- α . Bajo este procedimiento de ensayo, el IFN- α presente en la muestra de análisis se unirá al anticuerpo anti-IFN- α , permitiendo de ese modo que el anti-hapteno se una al conjugado, dando lugar a un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

Los ensayos sándwich son particularmente útiles para la determinación de IFN- α o anticuerpos anti-IFN- α . En los ensayos sándwich secuenciales se utiliza un anticuerpo anti-IFN- α inmovilizado para adsorber el IFN- α de muestra de análisis, se retira la muestra de análisis mediante lavado, se utiliza el IFN- α unido para adsorber un segundo anticuerpo anti-IFN- α marcado y a continuación se separa el material unido del trazador residual. La cantidad de trazador unido es directamente proporcional al IFN- α de muestra de análisis. En ensayos sándwich "simultáneos" la muestra de análisis no se separa antes de añadir el anti-IFN- α marcado. Un ensayo de sándwich secuencial utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α como un anticuerpo y un anticuerpo anti-IFN- α policlonal como el otro es útil en el análisis de muestras para IFN- α .

Los anteriores son ensayos de diagnóstico simplemente de ejemplo para IFN- α . Otros procedimientos desarrollados ahora y de aquí en adelante que utilizan anticuerpo anti-IFN- α para la determinación de IFN- α están incluidos dentro del alcance de la invención, incluyendo los bioensayos descritos anteriormente.

6. Composiciones terapéuticas y administración de anticuerpos anti-IFN- α

Se preparan las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-IFN- α de la invención para su almacenamiento mezclando anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables, (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co. (Easton, PA: 1995)), en forma de torta liofilizada o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica, la gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; y/o surfactantes no iónicos, tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

El anticuerpo anti-IFN- α para utilizar en la administración *in vivo* debe estar estéril. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución. El anticuerpo anti-IFN- α se almacenará normalmente en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones terapéuticas de anticuerpo anti-IFN- α generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

La ruta de administración del anticuerpo anti-IFN- α es según los procedimientos conocidos, por ejemplo inyección o inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, subcutánea, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, o intralesional, o mediante sistemas de liberación prolongada tal y como se indica más adelante. Preferiblemente se administra el anticuerpo sistémicamente.

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices de polímero semipermeable en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (US 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), acetato de etilvinilo (Langer et al., *supra*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). Las composiciones de anticuerpo anti-IFNAR2 de liberación prolongada también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen anticuerpos se preparan mediante procedimientos conocidos *per se*: DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; US 4.485.045 y 4.544.545; y EP102.324. Normalmente los liposomas son de tipo unilamelar y pequeños (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido lipídico es mayor que aproximadamente el 30% molar en colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para una terapia óptima con anticuerpos.

También puede administrarse el anticuerpo anti-IFN- α mediante inhalación. Para la administración son útiles los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores por inyección y nebulizadores ultrasónicos. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y el polvo liofilizado puede nebulizarse después de su reconstitución. De modo alternativo, puede pulverizarse el anticuerpo anti-IFN- α utilizando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis controlada, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

La “cantidad efectiva” de anticuerpo anti-IFN- α que se va a emplear terapéuticamente dependerá de, por ejemplo, los objetivos terapéuticos, la vía de administración, el tipo de anticuerpo anti-IFN- α empleado, y la patología del paciente. Por consiguiente, será necesario para el terapeuta titular la dosis y modificar la vía de administración tal y como se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Habitualmente, el médico administrará el anticuerpo anti-IFN- α hasta alcanzar una dosis que consigue el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales.

Los pacientes que van a tratarse con el anticuerpo anti-IFN- α de la invención incluyen pacientes preclínicos o aquellos con una aparición reciente de trastornos mediados por el sistema inmune, y particularmente trastornos autoinmunes. Los pacientes son candidatos para terapia según la presente invención hasta el punto en que no quede tejido sano que proteger de la destrucción mediada por el sistema inmune. Por ejemplo, un paciente que sufre de diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM) puede beneficiarse de la terapia con un anticuerpo anti-IFN- α de la invención hasta que las células de los islotes pancreáticos del paciente ya no sean viables. Es deseable administrar un anticuerpo anti-IFN- α tan pronto como sea posible en el desarrollo del trastorno mediado por el sistema inmune o autoinmune, y continuar el tratamiento el tiempo que sea necesario para la protección de tejido sano de la destrucción por parte del sistema inmune del paciente. Por ejemplo, se trata al paciente con IDDM hasta que la monitorización de insulina demuestra una respuesta del islote adecuada y otros indicios de disminución de necrosis del islote (por ejemplo reducción de títulos de anticuerpo anti-islote), después de lo cual el paciente puede retirarse del tratamiento con anticuerpo anti-IFN- α durante un periodo de prueba durante el cual se monitorizan la respuesta insulínica y el nivel de anticuerpos anti-islote por si hay recaída.

En el tratamiento y la prevención de un trastorno mediado por el sistema inmune o autoinmune mediante un anticuerpo anti-IFN- α , se formulará la composición del anticuerpo, se dosificará, y se administrará de un modo concordante con la buena práctica médica. Factores para considerar en este contexto incluyen el trastorno concreto que se está tratando, el mamífero concreto que se está tratando, la patología clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el punto de administración del anticuerpo, el tipo concreto de anticuerpo, el procedimiento de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La “cantidad terapéuticamente efectiva” de anticuerpo a administrar estará determinada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar el trastorno, incluyendo el tratamiento de condiciones autoinmunes crónicas y el mantenimiento de la inmunosupresión en receptores de trasplante. Dicha cantidad está preferible por debajo de la cantidad que es tóxica para el huésped o hace que el huésped sea significativamente más susceptible a las infecciones.

Como propuesta general, la cantidad inicial farmacéuticamente efectiva del anticuerpo administrado parenteralmente estará en el rango de aproximadamente 0,1 hasta 50 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el rango inicial típico de anticuerpo utilizado de 0,3 a 20 mg/kg/día, más preferiblemente de 0,3 a 15 mg/kg/día. La dosis deseada puede administrarse mediante una única administración en bolo, mediante múltiples administraciones en bolo, o mediante administración por infusión continua del anticuerpo, dependiendo del patrón de decompensación farmacocinética que el médico desee conseguir.

Tal y como se indica anteriormente, sin embargo, estas cantidades de anticuerpo sugeridas están sujetas a un gran acuerdo de criterio terapéutico. El factor clave en la selección de una dosis y una pauta apropiadas es el resultado obtenido, tal y como se indica anteriormente.

El anticuerpo no necesita formularse, aunque opcionalmente es así, con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno autoinmune o mediado por el sistema inmune en cuestión. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, puede administrarse el anticuerpo conjuntamente con un glucocorticosteroide. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-IFN- α presente en la formulación, el tipo de trastorno o de tratamiento, y otras vías de administración como las utilizadas anteriormente en la presente invención o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis empleadas hasta este momento.

Más detalles de la invención se pueden encontrar en el siguiente ejemplo, que define adicionalmente el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los ejemplos se proporcionan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y descripción de cómo fabricar y utilizar los

compuestos, composiciones y métodos de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar su precisión con respecto a los valores utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero debe tenerse en cuenta errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura en grados C y la presión es la presión atmosférica o próxima a la misma.

Ejemplo 1. Generación y caracterización de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α de ratón ampliamente reactivo

Materiales y Métodos

Un anticuerpo monoclonal murino con amplia reactividad contra subtipos de IFN- α

Se desarrolló un anticuerpo neutralizante de IFN- α de cribado mediante la inmunización secuencial de ratones con la mezcla de subtipos de IFN- α humanos, la generación de un amplio número de mAb candidatos y a continuación el cribado por la unión y actividad. En particular, se inmunizaron ratones Balb/c en cada base de pata trasera 9 veces (a intervalos de 2 semanas) con 2,5 :g de hIFN- α de linfoblastoide (Producto No I-9887 de Sigma, St. Louis, MO) resuspendido en MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT). Tres días después del refuerzo final, se fusionaron las células de nódulos linfáticos popliteales con células de mieloma murino P3X63Ag8.U.1 (ATCC CRL1597), utilizando polietilenglicol al 35%. Se seleccionaron los hibridomas en medio HAT. Diez días después de la fusión, se cribaron en primer lugar los sobrenadantes del cultivo de hibridoma por la unión de mAb a las diversas especies de hIFN- α en un ELISA. A continuación, se analizaron los sobrenadantes de cultivos de hibridoma seleccionados por su capacidad de inhibir el efecto citotático anti-viral del IFN en las células de la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 tal como se describe a continuación. Tal como se indica en la figura 1, tres mAb obtenidos de 1794 pocillos de fusión eran capaces de neutralizar una grupo diverso de subtipos de IFN- α . Estos tres mAb se subclonaron y se reanalizaron.

Neutralización de la actividad antiviral de IFN- α

La capacidad de un anticuerpo candidato de neutralizar la actividad antiviral de IFN- α se analizó tal como se describe por Yousefi, S., et al., Am. J. Clin. Pathol., 83: 735-740 (1985). Brevemente, el ensayo se realizó utilizando células A549 de carcinoma de pulmón humano estimuladas con el virus de encefalomiocarditis (EMC). Se incubaron diluciones en serie de mAb con varias unidades de interferones de tipo I durante una hora a 37°C en un volumen total de 100 :1. Estas mezclas se incubaron a continuación con 5×10^5 células A549 en 100:1 de un medio de cultivo celular durante 24 horas. A continuación, las células se estimularon con 2×10^5 pfu de virus de EMC durante 24 horas adicionales. Al final de la incubación, se determinó la viabilidad celular mediante un examen microscópico visual o tinción con violeta cristal. Se definió el título de anticuerpo neutralizante (EC_{50}) como la concentración de anticuerpo que neutraliza el 50% del efecto citotático antiviral por cada 100 unidades/ml de IFN de tipo I. Las unidades de IFN de tipo I utilizadas en este estudio se determinaron utilizando el IFN- α 2 humano recombinante de referencia de NIH como patrón. Las actividades específicas de los diversos IFN de tipo I fueron las siguientes: IFN- α 2/ α 1 (IFN- α 2 residuos 1,62/ α 1 residuos 64-166) (2×10^7 IU/mg), IFN- α 1 (3×10^7 IU/mg), IFN- α 2 (2×10^7 IU/mg), IFN- α 5 (8×10^7 IU/mg), IFN- α 8 (19×10^7 IU/mg), e IFN- α 10 ($1,5 \times 10^5$ IU/mg). El IFN de leucocito analizado fue de Sigma Producto No. I-2396. El IFN de linfoblastoide analizado fue el patrón de referencia de NIH Ga23-901-532. Los datos mostrados en la figura 3B se obtuvieron utilizando el formato de ensayo descrito anteriormente en experimentos realizados por Access Biomedical (San Diego, CA) a instancias del solicitante.

Ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética

La mayoría de las acciones inmediatas del IFN se han unido a la activación de transductores de señales citoplasmáticas latentes y a activadores de proteínas de transcripción (STAT) para producir un complejo multiproteico, factor-3 del gen estimulado por interferón (ISGF3), que induce la transcripción a partir del elemento de respuesta estimulado por el interferón (ISRE) promotor de la diana. El ISGF3 está compuesto de tres subunidades de proteína: STAT1, STAT2 y p48/ISGF3 γ . La proteína p48 pertenece a la familia de factores reguladores de interferones (IRF) y es una proteína de unión a ADN que interacciona directamente con ISRE. De este modo, la monitorización del complejo de unión a ADN celular específico de ISRE en respuesta al tratamiento con IFN proporciona un método simple, rápido y conveniente para valorar el efecto del IFN en células diana. Uno de los formatos convenientes para llevar a cabo dicho análisis es el ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA), donde la inducción de una actividad de unión a ISRE por el tratamiento con IFN da lugar al desplazamiento en la movilidad electroforética de una sonda de oligonucleótidos de doble cadena radiomarcados correspondiente a la secuencia consenso de ISRE.

El ensayo se llevó a cabo esencialmente tal como se describe por Kurabayashi et al., Mol. Cell Biol., 15: 6386 (1995). Brevemente, se incubaron 5 ng de un subtipo específico de IFN- α más varias concentraciones (5-100 μ g/ml) de mAb anti-IFN- α con 5×10^5 de células HeLa en 200 μ l de DMEM durante 30 minutos a 37°C. Las células se preincubaron con anticuerpo durante 15 minutos a 4°C antes de la adición de hIFN- α . Las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en 125 μ l de tampón A (HEPES 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, fluoruro

de fenilmetilsulfonilo 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml). Después de incubación de 15 minutos en hielo, las células se lisaron mediante la adición de NP40 al 0,025%. El residuo nuclear se obtuvo mediante centrifugación y se resuspendió en 50 µl de tampón B (HEPES 20 mM, pH 7,9, NaCl 400 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, fluoruro de fenilmetildulsonilo 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. La fracción nuclear se purificó mediante centrifugación y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso. Las sondas de doble cadena se prepararon a partir de oligonucleótidos de cadena sencilla (ISG15 superior: 5'-GATCGGGAAAGGGAAACCGAACTGAAGCC-3' [SEC ID NO. 13], ISG15 inferior: 5'-GATCGGCTTCAGTTTCGGTTTCCCTTTC CC-3' [SEC ID NO. 14]) utilizando una reacción de relleno Klenow con ADN polimerasa I con ³²P- dATP (3.000 Ci/mM, Amersham). Los oligonucleótidos marcados se purificaron a partir de nucleótidos radiactivos no incorporados utilizando columnas BIO-Spin 30 (Bio-Rad). Las reacciones de unión que contenían 5 µl de extracto nuclear, 25.000 cpm de sonda marcada y 2 µg de ompetidos no específico poli (dl-dC)-poli (dl-dC) en 15 µl de tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y glicerol al 15%) se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los complejos de ADN-proteína se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 6% y se analizaron mediante autorradiografía. La especificidad del ensayo se determinó mediante la adición de 350 ng de sonda ISG 15 no marcada en mezclas de reacción separadas. La formación de un complejo específico de ISGF3 se confirmó mediante un ensayo de super desplazamiento con anticuerpo anti-STAT1.

Clonación de un gen que codifica un anticuerpo monoclonal anti-IFN-α 9F3

Se generó, clonó y secuenció el mAb 9F3 anti-IFN-α humano de murino. El plásmido pEMX1 utilizado para la expresión y la mutagénesis de F(ab) en E. coli se ha descrito previamente (Werther et al., J. Immunol. 157: 4986-4995 [1996]). Brevemente, el plásmido contiene un fragmento de ADN que codifica una cadena ligera del subgrupo 1 κ humana de consenso (VLκI-CL) y una cadena pesada del subgrupo III humana de consenso (VHIII-CH1) y un promotor de fosfatasa alcalina. La utilización de las secuencias de consenso para VL y VH se han descrito previamente (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992]).

Resultados

Se ha observado previamente qe existe un amplio espectro de subtipos de IFN-α expresados por los islotes de pacientes con IDDM (Huang et al., Diabetes 44: 658-664 [1995]). También se desmotró que no existía una asociación obvia entre IDDM y la expresión de IFN-β o IFN-γ (Huang et al., [1995] supra). Aunque no se han identificado los subtipos de IFN-α específicos expresados como parte de la patología de SLE, como con IDDM, la asociación es con IFN-α y no con IFN-β o IFN-γ (Hooks, et al., Arthritis & Rheumatism 25: 396-400 [1982]; Kim, et al., Clin. Exp. Immunol. 70: 562-569 [1987]; Lacki, et al., J. Med. 28: 99-107 [1997]; Robak, et al., Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 46: 375-380 [1998]; Shiozawa, et al., Arthritis & Rheumatism 35: 417-422 [1992]; von Wussow, et al., Rheumatology International 8: 225-230 [1988]). Estas observaciones nos llevaron a proponer que un anticuerpo candidato para la intervención terapéutica en IDDM o SLE no necesitaría neutralizar la mayoría de los subtipos de IFN-α, dejando intactas las actividades de otros interferones (β, γ y ω) e interleuquinas que se pueden necesitar para la defensa del huésped.

Uno de ellos (9F3) fue capaz de neutralizar un amplio espectro de subtipos de interferón α recombinante y se caracterizó posteriormente. Tal como se muestra en la figura 2A, el 9F3 fue capaz de neutralizar la actividad antiviral de siete interferones recombinantes, IFN-α - 2, 4, 5, 8 y 10 (figura 2) e IFN-α 1 y 21 (Tabla 2 y la figura 6). Estos subtipos de IFN-α cubren el espectro completo de secuencias proyectadas en in dendrograma de secuencias de interferón de tipo I. De manera más destacada, el mAb 9F3 que neutralizaba los subtipos de IFN-α era incapaz de neutralizar IFN-β (figura 2, Tabla 2) o IFN-γ. El incremento pequeño en la actividad mostrada en la figura 2 para IFN-β no era reproducible en otros ensayos y parece ser el resultado de la variación del ensayo.

Se han desarrollado otros mAbs que son neutralizantes hacia IFN-α (Tsukui et al., Microbiol. Immunol. 30: 1129-1139 [1986]; Berg, J. Interferon Res. 4: 481-491 [1984]; Meager y Berg, J. Interferon Res. 6:729-736 [1986]; patente de Estados Unidos No. 4,902,618; y la publicación EP No. 0,139,676 B1). Sin embargo, estos anticuerpos neutralizan sólo un número limitado de subtipos de IFN-α recombinantes y son incapaces de neutralizar un amplio espectro de subtipos de IFN-α, tales como los producidos por leucocitos activados. En cambio, el mAb 9F3 era capaz de neutralizar por lo menos un 95% de la actividad anti-viral en la colección heterogénea de los subtipos de IFN-α producidos por leucocitos activados (figura 3A). De manera similar, el mAb 9F3 también era capaz de bloquear la actividad antiviral de una preparación independiente de IFN linfoblastoide (patrón de referencia de NIH) determinado en un experimento independiente (figura 3B).

La capacidad de mAb 9F3 de neutralizar IFN-α también se analizó utilizando un bioensayos alternativo. El ensayo se basaba en la capacidad de IFN-α de activar la unión de la molécula de señalización, el factor 3 del gen estimulado por interferón (ISGF3), a un oligonucleótido derivado del elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) en un ensayo de unión a ADN conocido como ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (Horvath et al., Genes Dev. 9: 984-994 [1995]). La transducció de las señales de interferón de tipo I al núcleo depende de la activación de un complejo proteico, ISGF3, que implica dos transductores de señales y activadores de las proteínas

de transcripción (STAT), STAT1 y STAT2, y la proteína del factor regulador de interferón (IRF), p48/ISGF3y (Wathelet et al., Mol. Cell 1: 507-518 [1998]). Ésta última es una subunidad de ISGF3 de reconocimiento de la secuencia de ADN e interacciona directamente con ISRE (McKendry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11455-11459 [1991]; John et al., Mol. Cell. Biol. 11: 4189-4195 [1991]). El tratamiento de células COS con IFN- α o IFN- β condujo a la aparición de un complejo correspondiente a la unión de ISGF3 a la sonda derivada de ISRE. La aparición del complejo inducido por IFN- α , pero no el complejo inducido por IFN- β se bloqueó por el mAb 9F3 (figura 4). Además, el mAb 9F3 era capaz de neutralizar la actividad de seis subtipos de IFN- α recombinante que se analizaron en este ensayo (Tabla 2).

Tabla 2

Inhibición de la formación de ISGF3 inducida por los IFN de tipo I por el mAb 9F3							
mAb	IFN- α 2/1	IFN- α 1	IFN- α 2	IFN- α 5	IFN- α 8	IFN- α 21	IFN- β
9F3.18.5	+++	+++	+++	+	+++	+++	-
IgG 1	-	-	-	-	-	-	-

Se indica el grado de inhibición del complejo inducido por IFN por 9F3, donde - indica que la banda inducida no estaba alterada; + indica que la banda se perdió parcialmente y +++ indica que la banda inducida se eliminó totalmente. Se utilizó mAb a 10 μ g/ml; IFN- α se utilizó a 25 ng/ml

Habiendo establecido que 9F3 era capaz de neutralizar tanto una amplia variedad de subtipos de IFN- α recombinante como la mezcla de subtipos de IFN- α producidos por leucocitos activados, se clonó y secuenció los ADNc que codificaban tanto la cadena pesada como la cadena ligera del mAb 9F3. Las cadenas pesada y ligera se purificaron y se utilizaron las secuencias de aminoácidos N-terminales derivadas para diseñar cebadores 5' degenerados correspondientes al extremo N terminal, y se diseñaron los cebadores 3' correspondientes al dominio constante de la cadena ligera κ de ratón y la cadena pesada de IgG2. Los ADNc correspondientes se clonaron utilizando técnica de PCR convencional y se determinó la secuencia de nucleótidos de los insertos. La figura 5 muestra la alineación de secuencias de los dominios VL (5A) y VH (5B) de un anticuerpo monoclonal 9F3 murino, una versión humanizada (V13) y una secuencia consenso del subgrupo III de cadena pesada humana y el subgrupo III de cadena ligera κ humana. A efectos de asegurar que los ADNc que se clonaron codificaban el mAb correcto reflejando la especificidad y características de mAb 9F3, se generaron proteínas quiméricas recombinantes que utilizaban las secuencias de ADNc de ratón mostradas en la figura 5 y un dominio CH1 humano. La quimera resultante (CH8-2) era capaz de neutralizar completamente varios subtipos de IFN- α recombinante (figura 6). A continuación, se utilizaron las secuencias de aminoácidos para las cadenas pesada y ligera para generar un anticuerpo humanizado.

Ejemplo 2. Humanización de anticuerpo monoclonal neutralizante IFN- α 9F3 por cribado

Materiales y métodos

Construcción de F(ab) humanizados

Para construir la primera variante de F(ab) de 9F3 humanizado, se realizó una mutagénesis dirigida de sitio (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 [1985]) en una plantilla que contenía desoxiuridina de pEMX1. Las seis CDR se cambiaron en la secuencia de 9F3 murino (figura 5); los residuos incluidos en cada CDR eran de las definiciones de CDR basadas en la secuencia (Kabat et al., (1991) supra). Por lo tanto, F-1 consistía en un armazón humano completo (subgrupo 1 κ de VL y subgrupo III de VH) con las seis secuencias de CDR murino completas. Los plásmidos para todas las otras variantes de F(ab) se construyeron a partir de la plantilla del plásmido de F-1. Los plásmidos se transformaron en la cepa XL-1 Blue de E. coli (Stratagene, San Diego, CA) para la preparación de ADN de cadena doble y cadena sencilla utilizando kits comerciales (Qiagen, Valencia, CA). Para cada variante, el ADN que codificaba las cadenas ligera y pesada se secuenció completamente utilizando el método de terminación de cadena con didesoxinucleótido (Sequenase, U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH). Los plásmidos se transformaron en la cepa 16C9 de E. coli, un derivado de MM294, se emplacaron en placas con caldo de Luria que contenían 50 μ g/ml de carbenicilina, y se seleccionó una única colonia para la expresión de proteína. La única colonia se desarrolló en 5 ml de caldo de Luria-100 μ g/ml de carbenicilina durante 5-8 h a 37°C. Se añadió un cultivo de 5 ml a 500 ml de medio AP5 que contenía 50 μ g/ml de carbenicilina y se dejó crecer durante 20 h en un matraz de agitación deflector de 4 L a 30°C. El medio AP5 consistía en: 1,5 g de glucosa, 11,0 g de Hycase SF, 0,6 g de extracto de levadura (certificado), 0,19 g de MgSO₄ (anhidro), 1,07 g de NH₄Cl, 3,73 g de KCl, 1,2 g de NaCl, 120 ml de trietanolamina 1 M, pH 7,4, hasta 1 L de agua y a continuación se filtró de forma estéril a través de un filtro Sealkeen de 0,1 μ m. Las células se recogieron mediante centrifugación en una botella de centrifuga de 1 L a 3000xg y se extrajo el sobrenadante. Después de congelarse durante 1 h, se resuspendió el residuo en 25 ml de Tris 10 mM frío, EDTA 1 mM al 20%, sacarosa, pH 7,5, se añadieron 250 μ l de benzamidina 0,1 M (Sigma, St. Louis, MO) para inhibir la proteólisis. Después de agitación suave en hielo durante 3 horas, la muestra se centrifugó a 40.000xg durante 15 min. A continuación, se aplicó el sobrenadante a una columna de Proteína G-Sefarosa CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (volumen de lecho de 0,5 ml) equilibrada con Tris 10 mM-EDTA 1 mM, pH 7,5. La

columna se lavó con 10 ml de Tris 10 mM-EDTA 1 M, pH 7,5, y se eluyó con 3 ml de glicina 0,3 M, pH 3,0 en 1,25 ml de Tris 1 M, pH 8,0. A continuación el F(ab) se intercambió en el tampón con PBS utilizando un Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) y se concentró hasta un volumen final de 0,5 ml. Se desarrollaron geles de SDS-PAGE de todos los F(ab) para establecer la pureza y se verificó el peso molecular de cada variante mediante espectrometría de masas por electrospray. Las concentraciones de F(ab) se determinaron utilizando un análisis cuantitativo de aminoácidos.

Construcción de IgG quimérico y humanizado

Para la generación de las versiones de IgG2 humanas de 9F3 quimérico y humanizado, se subclonaron los dominios de VL y VH (F-13, tabla 3) murinos o humanizados apropiados en los vectores pRK separados descritos previamente (Eaton et al., Biochemistry 25: 8343-8347 [1986]) que contenían el ADN que codifica el CH1-Fc de IgG2 humano o el dominio de cadena ligera CL humano. El ADN que que codificada la cadena ligera completa y la cadena pesada completa de cada variante se verificó mediante la secuenciación de dideoxinucleótidos. La IgG quimérica consiste en el dominio de VH de 9F3 murino completo fusionado a un dominio CH1 humano en el aminoácido SerHI 13 y el dominio de VL de 9F3 murino completo fusionado a un dominio de CL humano en el aminoácido LysL 10.7.

Los plásmidos de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en una línea celular de riñón embrionario humano transformado con adenovirus, 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59-74 [1977]), utilizando un procedimiento de eficacia elevada (Gorman et al., DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10 [1990]). Se cambió el medio a libre de suero y se recogió diariamente durante cinco días. Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes agrupados utilizando Proteína A-Sefarosa CL-4B (Pharmacia). El anticuerpo eluido se intercambió en el tampón por PBS utilizando un Centricon-30 (Amicon), se concentró hasta 0,5 ml, se filtró de forma estéril utilizando un Millex-GV (Millipore, Bedford, MA) y se almacenó a 4°C. Se determinaron las concentraciones de IgG2 utilizando un análisis cuantitativo de aminoácidos.

Ensayo de unión a IFN- α

En el ELISA, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) mediante la adición de 50 μ l de IFN- α 0,1 μ g/ml en PBS a cada pocillo y se incubaron a 4°C durante la noche. A continuación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS más Tween 20 al 0,05%). A continuación, se bloquearon los pocillos en placas de microtitulación con 200 μ l de SuperBlock (Pierce) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado. Después de la etapa de lavado, se añadieron a los pocillos designados 100 μ l de diluciones en serie de mAb humanizado empezando a 10 μ g/ml. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un aparato de agitación y a continuación se lavaron tres veces con tampón de lavado. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de Fab específico anti-humano de cabra (Cappel) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), diluido a 1:1000 en un tampón de ensayo (albúmina de suero bovino al 0,5%, Tween 20 al 0,05% en PBS). Las placas se incubaron a temperatura ambiente en un aparato de agitación y a continuación se lavaron tres veces con tampón de lavado, seguido de la adición de 100 μ l de sustrato (TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; Kirkegaard & Perry) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l de solución de detención (de Kirkegaard & Perry) a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación automatizado.

Ensayo de biosensor BIAcore™

Se midió la unión a IFN- α de los F(ab) humanizados, los anticuerpos IgG2 quiméricos y humanizados utilizando un biosensor BIAcore™ (Karlsson et al., Methods: A. companion to Methods in Enzymology 6: 97-108 [1994]). Se inmovilizó el IFN- α en un chip sensor a 60 μ g/ml en tampón MES 50 mM, pH 6,3. Los anticuerpos se expusieron al chip a 75 μ g/ml (500 nM) en solución salina tamponada con fosfato/Tween-20 al 1%. Se midió la velocidad on (k_{on}) del anticuerpo

Modelo de gráficos computerizados de F(ab) murinos y humanizados

Se utilizaron las secuencias de los dominios de VL y VH (figura 5A y B) para construir un modelo de gráficos computerizados de los dominios de VL-VH de 9F3 murinos (figura 7). Este modelo se utilizó para determinar qué residuos del armazón deben incorporarse en el anticuerpo humanizado. También se construyó un modelo de F(ab) humanizado para verificar la selección correcta de los residuos del armazón murino. Las construcción de los modelos se realizó tal como de ha descrito previamente (Carter et al., [1992] supra; Werther et al., [1996] supra).

Resultados

Las secuencias consenso para el subgrupo III de cadena pesada humana y el subgrupo I de la cadena ligera se utilizaron como el armazón para la humanización tal como se muestra en la figura 5 (Kabat et al., (1991), supra).

Este armazón se ha utilizado satisfactoriamente en la humanización de otros anticuerpos murinos (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992]; Presta et al., J. Immunol. 151: 2623-2632 [1993]; Eigenbrot et al., Proteins 18: 49-62 [1994]; Werther et al., J. Immunol. 157: 4986-4995 [1996]). Todas las variantes humanizadas se produjeron inicialmente y se cribaron por la unión como F(ab) expresados en E. coli. Los rendimientos habituales de matraces de agitación de 500 ml fueron de 0,1-0,4 mg de F(ab).

Los residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) se han definido en base a la hipervariabilidad de la secuencia (Kabat et al., (1991) supra) o la estructura cristalina de los complejos F(ab)-antígeno (Chothia et al., Nature 342: 877-883 [1989]). Aunque las CDR basadas en la secuencia son más amplias que las CDR basadas en la estructura, las dos definiciones están en general de acuerdo a excepción de CDR-H1. Según la definición basada en la secuencia, CDR-H1 incluye los residuos H31-H35, mientras que el sistema basado en la estructura define los residuos H26-H32 como CDR-H1 (a los números de los residuos de cadena ligera se les pone el prefijo L; a los números de los residuos de cadena pesada se les pone el prefijo H). Para el presente estudio, se definió CDR-H1 como la combinación de los dos, es decir incluyendo los residuos H26-H35. Las otras CDR se definieron utilizando la definición basada en la secuencia (Kabat et al., (1991) supra).

En la variante inicial, F-1, los residuos de CDR se transfirieron del anticuerpo murino al armazón humano. Además, se generaron F(ab) que consistían en la cadena pesada quimérica con la cadena ligera de F-1 (Ch-1) y la cadena pesada de F-1 con la cadena ligera quimérica (Ch-2) y se analizó la unión. El F-1 se unió escasamente a IFN- α (Tabla 3). La comparación de las afinidades de unión de Ch-1 y Ch-2 (Tabla 3) sugirió que los residuos de armazón en el dominio de VH de F-1 necesitaban ser alterados a efectos de incrementar la unión.

Tabla 3

Versiones de anti-IFN- α humanizados					
Versión	Plantilla	Cambios ^a	DO _{450 nm} a 10 μ g/ml		
			Media	SD	N
Ch-1	VL de F-1/VH murino		1,45	0,11	3
Ch-2	VL murino/VH de F-2		0,024	0,04	3
F-1	intercambio de FR/CDR humano		0,06	0,00	3
F-2	F-1	ArgH71 Leu ;	0,08	0,01	3
F-3	F-2	AsnH73 Lys	0,14	0,02	3
		PheH67 Ala			
F-4	F-3	IleH69 Leu	0,495	0,02	3
		LeuH78 Ala			
F-5	F-4	ArgH94 Ser	0,545	0,03	3
F-6	F-5	AlaH24 Thr	0,527	0,02	2
F-7	F-5	ValH48 Ile	0,259	0,02	2
		AlaH49 Gly			
F-8	F-5	Ala H78 Leu	0,523	0,05	3
F-9	F-5	Leu H69 Ile	0,675	0,09	3
F-10	F-9	Ala H67 Phe	0,690	0,03	3
F-11	F-10	Leu H69 Ile	0,642	0,06	3
F-12	F-10	LysH75 Ser	0,912	0,05	3
F-13	F-12	AsnH76 Arg	1,050	0,16	3
F-14	F-13	LeuL46 Val	0,472	0,06	3
		TyrL49 Ser			
F-15	F-13	Leu H71 Arg	0,868	0,32	3
		Lys H73 Asn			

^a Los residuos murinos están en grita; los números de residuos según Kabat et al. (1991). El texto estándar indica un cambio de un residuo de armazón humano a ratón. El texto en cursiva indica un cambio de un residuo de armazón de ratón en humano. La unión de Fab a IFN- α se analizó mediante ELISA y los resultados se proporcionan como DO_{450 nm} a 10 μ g/ml, SD, desviación estándar; n, número de replicas experimentales.

Las humanizaciones previas (Xiang et al., J. Mol. Biol. 253: 385-390 [1995]; Werther et al., [1996] supra), así como los estudios de estructuras cristalinas de F(ab)-antígeno (Chothia et al., [1989] supra; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215: 175-182 [1990]) han mostrado que los residuos H71 y H73 pueden tener un profundo efecto en la unión, posiblemente mediante la influencia de las conformaciones de CDR-H1 y CDR-H2. El cambio de los residuos humanos en las posiciones H71 y H73 a sus homólogos murinos mejoró la unión sólo ligeramente (versión F-2, Tabla 3). Los cambios simultáneos adicionales en las posiciones H67, H69 y H78 (versión F-3) seguidos de los cambios ArgH94Ser (versión F-4) y AlaH24Thr (versión F-5) mejoraron significativamente la unión (Tabla 3). Dado

que las posiciones H67, H69 y H78 se habían cambiado simultáneamente, cada uno se alteró de nuevo individualmente al residuo del armazón consenso humano; las versiones F-7, F-8, F-9, y F-10 muestran que el residuo humano es preferido en la posición H67, la posición H69 no muestra ninguna preferencia para el residuo humano o murino, y el residuo murino es preferido en la posición H78.

Se han hallado durante las humanizaciones previas que los residuos en un bucle de armazón, FR-3 (Kabat et al., (1991) supra), adyacente a CDR-H1 y CDR-H2, pueden afectar a la unión (Eigenbrot et al., (1994) supra). Por consiguiente, se cambiaron dos residuos en este bucle por sus homólogos murinos: LysH75 a Ser murina (versión F-11) y AsnH76 a Arg murina (versión F-12). Sólo el cambio AsnH76Arg produjo una mejora en la unión (Tabla 3).

La inspección de los modelos de F(ab) murinos y humanizados sugirió que el residuo L46, escondido en la interfase VLVH y que interacciona con CDR-H3, también podría jugar un papel en la determinación de la conformación de CHR-H3 y/o afectar en las interacciones entre los dominios VL y VH. De manera similar, la posición L49 que es adyacente a CDR-L2 difiere entre la secuencia consenso humana (Tyr) y la secuencia de 9F3 (Ser). Por lo tanto, los residuos LeuL46Val y TyrL49Ser se sustituyeron simultáneamente, lo que dio lugar a una variante (F-13) con una mejora adicional en la unión (Tabla 3). En base a su mejor unión entre todas las variantes generadas, se eligió F-13 como la versión humanizada final.

Se generó un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α recombinante humanizado (V13IgG2) mediante la fusión de los dominios VH y VL derivados de F-13 a CH1-Fc de IgG2 humano y los dominios CL humanos, respectivamente. Las velocidades K_{ON} y los valores K_D de V13IgG2 se compararon a continuación con una IgG2 quimérica o 9F3 murina. La medición con BIAcore™ de la unión de V13IgG2 e IgG2 quimérica a IFN- α inmovilizado mostró que sus valores K_{ON} eran similares (Tabla 4). La medición de la afinidad utilizando tecnología Kinexa™ mostró que la afinidad de V13IgG2 por IFN α se redujo en 2 veces en comparación con el anticuerpo 9F3 murino parental (Tabla 4).

Tabla 4

Datos de BIAcore™ y Kinexa™ para anticuerpos anti-IFN- α			
Anticuerpo ^a	K_{ON} (μ M/s)	K_D (nM) ^b	Método
ChIgG2	3,9	0,14	BIAcore™
V13IgG2	3,3		BIAcore™
V13Fab			BIAcore™
Anticuerpo ^a	K_D (pM)	4,1	BIAcore™
9F3 murino	1,5		Kinexa™
V13Fab	3,4		Kinexa™

^a V13IgG2 es un dominio VH de F-13 unido a CH1-Fc de IgG2 humana y el dominio de VL de F-13 unido a un dominio de CL humano; ChIgG2 es un dominio de VH de 9F3 de ratón unido a CH1-Fc de IgG2 humana y el dominio de VL de 9F3 de ratón unido al dominio de CL humano. ^bKoff/Kon.

Depósito de Material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
1. Línea celular de hibridoma que secreta los anticuerpos monoclonales anti-IFN- α 9F3 murinos (Id. Ref.: 9F3.18.5)	PTA-2917	18 de enero de 2001
2. Vector basado en pRK para la expresión de la cadena pesada de IgG de longitud completa CH8-2 quimérica (Id. Ref.: XAIFN-ChHpDR2)	PTA-2883	9 de enero de 2001
3. Vector basado en pRK para la expresión de la cadena ligera de IgG de longitud completa CH8-2 quimérica (Id. Ref.: XAIFN-ChLpDR1)	PTA-2880	9 de enero de 2001
4. Vector basado en pRK para la expresión de la cadena pesada de la IgG3 de longitud completa V13 humanizada (Id. Ref.: VHV30-IgG2)	PTA-2881	9 de enero de 2001
5. Vector basado en pRK para la expresión de la cadena ligera de la IgG3 de longitud completa V13 humanizada (Id. Ref.: VLV30-IgG2)	PTA-2882	9 de enero de 2001

Este depósito se realizó según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. El depósito estará disponible mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o

extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, las diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas aquí serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.
Chuntharapai, Anan Kim,
Jin K. Stewart,
Timothy Presta,
Leonard G.

<120> ANTICUERPOS ANTI-INTERFERÓN-ALFA
<130> GENENT.074VPC

<150> 60/270775
<151> 2001-02-22

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 114
<212> PRT
<213> Murino

<400> 1

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

<210> 2
<211> 119
<212> PRT

<213> Murino
<400> 2

```

5   Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
    1           5           10           15
    Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
          20           25           30
10  Ile Ile His Trp Val Lys Gln Gly His Gly Arg Ser Leu Glu Trp Ile
      35           40           45

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

```

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Esta secuencia representa un anticuerpo quimérico humanizado que comprende secuencias humanas y no humanas.

<400> 3

```

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

```

<210> 4
<211> 110
60 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

5	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10				15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr
				20					25					30		
10	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45			
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
15	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp
20																
					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val		
				100					105					110		
25																
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
30	<223> Esta secuencia representa un anticuerpo quimérico humanizado que comprende secuencias humanas y no humanas.															
	<400> 5															
35	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
				20					25					30		
40	Ile	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40						45			
	Ala	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe
		50					55					60				
45	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Lys	Ser	Lys	Arg	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
50	Ala	Ser	Trp	Ile	Ser	Asp	Phe	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser									
				115												
55																
	<210> 6															
	<211> 119															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
60	<400> 6															

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

25 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 7
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

35	<210>	8
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens

<400> 8
40 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

45 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
50 Gln His Ser Trp Gly Ile Pro Arg Thr Phe
1 5 10

	<210>	10
	<211>	10
	<212>	PRT
55	<213>	Homo sapiens

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His
1 5 10

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

65 <400> 11
Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys

ES 2 378 062 T3

	1	5	10	15
	Gly			
	<210> 12			
5	<211> 8			
	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 12			
10	Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr			
	1 5			
	<210> 13			
15	<211> 30			
	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 13			
20	gatcgggaaa gggaaaccga aactgaagcc		30	
	<210> 14			
	<211> 30			
	<212> ADN			
25	<213> Homo sapiens			
	<400> 14			
	gatcggcttc agtttcggtt tcccttccc		30	

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-IFN- α que comprende

- 5 (A) por lo menos una cadena ligera o un fragmento de la misma que comprende las siguientes CDR:
(a) L1 de la fórmula RASQSVSTSSYSYMH (SEC ID NO:7);
(b) L2 de la fórmula YASNLES (SEC ID NO:8); y
(c) L3 de la fórmula QHSWGIPRTF (SEC ID NO:9); y
- 10 (B) por lo menos una cadena pesada o un fragmento de la misma que comprende las siguientes CDR:
(a) H1 de la fórmula GYTFTEYIIH (SEC ID NO:10);
(b) H2 de la fórmula SINPDYDITNYNQRFKG (SEC ID NO: 11); y
(c) H3 de la fórmula WISDFFDY (SEC ID NO:12);
- 15 cuyo anticuerpo se une y neutraliza una actividad biológica de por lo menos los subtipos IFN- α , IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10, e IFN- α 21.
- 20 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que tiene una estructura homo-tetramérica compuesta de dos pares de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo unidos por puentes disulfuro.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo lineal.
4. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo murino.
- 25 5. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo quimérico.
6. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado.
7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es de la clase IgG.
- 30 8. Anticuerpo según la reivindicación 7, que tiene un isotipo IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄.
9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un fragmento de anticuerpo.
- 35 10. Anticuerpo según la reivindicación 9, que es un fragmento Fab.
11. Anticuerpo según la reivindicación 9, que es un fragmento F(ab')₂.
12. Anticuerpo según la reivindicación 9, que es un fragmento Fab'.
- 40 13. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α humano 9F3 producido por un hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-2917 o una forma humanizada o quimérica del mismo.
- 45 14. Anticuerpo según la reivindicación 5, que comprende
(i) la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera quimérica, o la secuencia de aminoácidos completa de la cadena ligera quimérica, codificada por el vector XAIFN-ChLpDR1 que tiene el número de acceso ATCC PTA-2880, y
(ii) la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada quimérica, o la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada quimérica, codificada por el vector XAIFN-ChLpDR2 que tiene el número de acceso ATCC PTA-2883.
- 50 15. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 55 16. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15.
17. Célula huésped transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15.
- 60 18. Método de producción del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende cultivar una célula huésped según la reivindicación 17 bajo condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo.
19. Línea celular de hibridoma que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15.
- 65 20. Línea celular de hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-2917.

21. Anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de la reivindicación 20.
22. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 21 en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo según la reivindicación 13 en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
24. Método para el diagnóstico de una patología autoinmune o mediada por el sistema inmune asociada con la expresión de IFN- α que comprende poner en contacto una célula aislada con un anticuerpo anti-IFN- α según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 21, y detectar la presencia de IFN- α .
25. Utilización de un anticuerpo anti-IFN- α según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 21 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o patología autoinmune o mediada por el sistema inmune asociada con la expresión de IFN- α en un paciente.
26. Utilización según la reivindicación 25, en la que dicho paciente es un paciente mamífero.
27. Utilización según la reivindicación 26, en la que dicho paciente es humano.
28. Utilización según la reivindicación 27, en la que dicha enfermedad es una enfermedad autoinmune.
29. Utilización según la reivindicación 28, en la que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en diabetes melitus insulino dependiente (IDDM); lupus eritematoso sistémico (SLE); y tiroiditis autoinmune.
30. Anticuerpo anti-IFN- α según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 21 para utilizar en un método de tratamiento de una enfermedad o patología autoinmune o mediada por el sistema inmune asociada con la expresión de IFN- α en un paciente.
31. Anticuerpo anti-IFN- α para utilizar en un método según la reivindicación 30, en el que dicho paciente es un paciente humano.
32. Anticuerpo anti-IFN- α para utilizar en un método según la reivindicación 31, en el que dicho paciente es humano.
33. Anticuerpo anti-IFN- α para utilizar en un método según la reivindicación 30, en el que dicha enfermedad es una enfermedad autoinmune.
34. Anticuerpo anti-IFN- α para utilizar en un método según la reivindicación 33, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en diabetes melitus insulino dependiente (IDDM); lupus eritematoso sistémico (SLE); y tiroiditis autoinmune.
35. Método de detección o determinación de IFN- α en una muestra biológica aislada que comprende mezclar la muestra con un anticuerpo anti-IFN- α según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 21, permitir que el anticuerpo forme el complejo anticuerpo/IFN- α con cualquier subtipo de IFN- α presente en la mezcla, y detectar cualquier complejo anticuerpo/IFN- α presente en la mezcla.

Figura 1

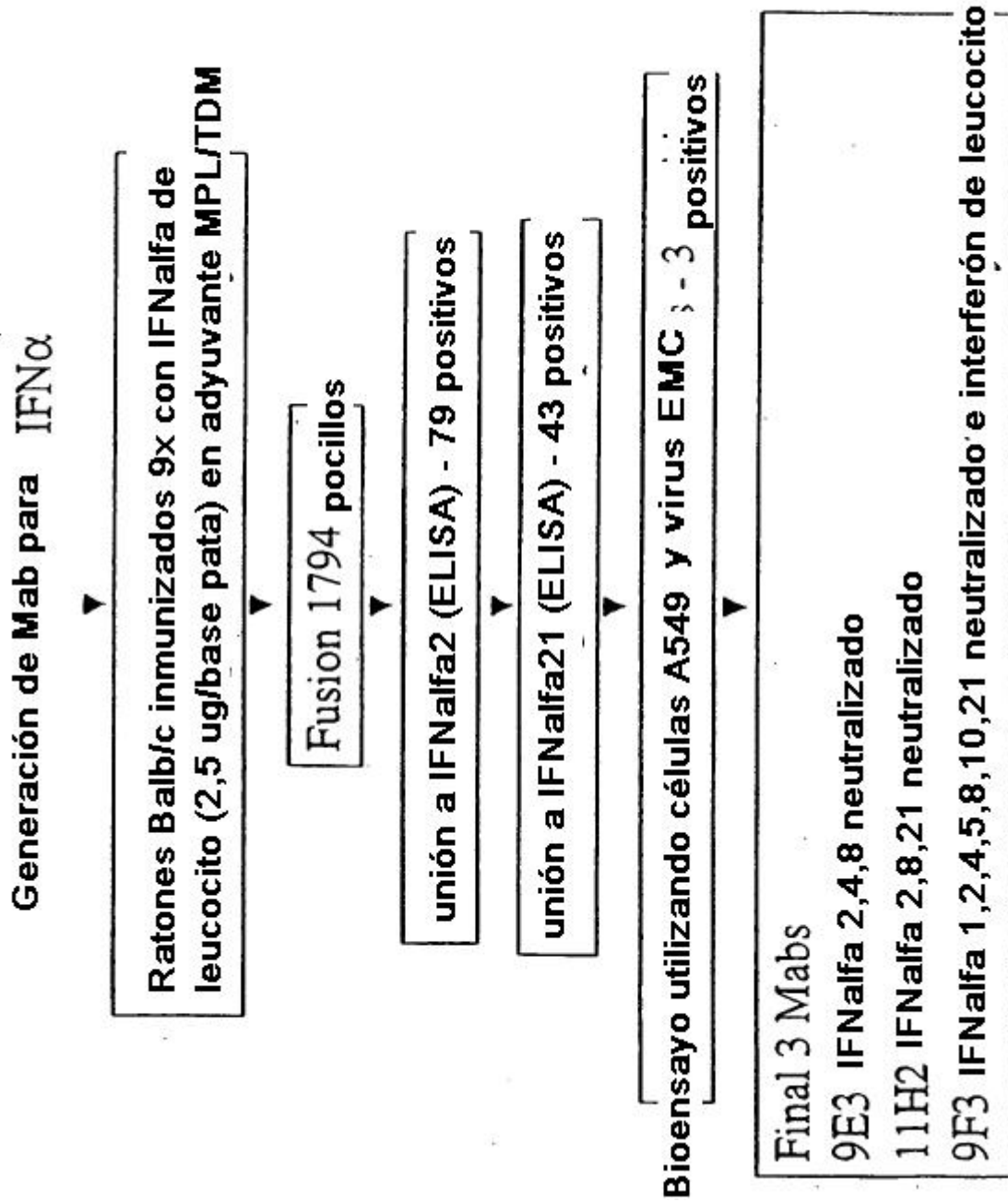


Figura 2

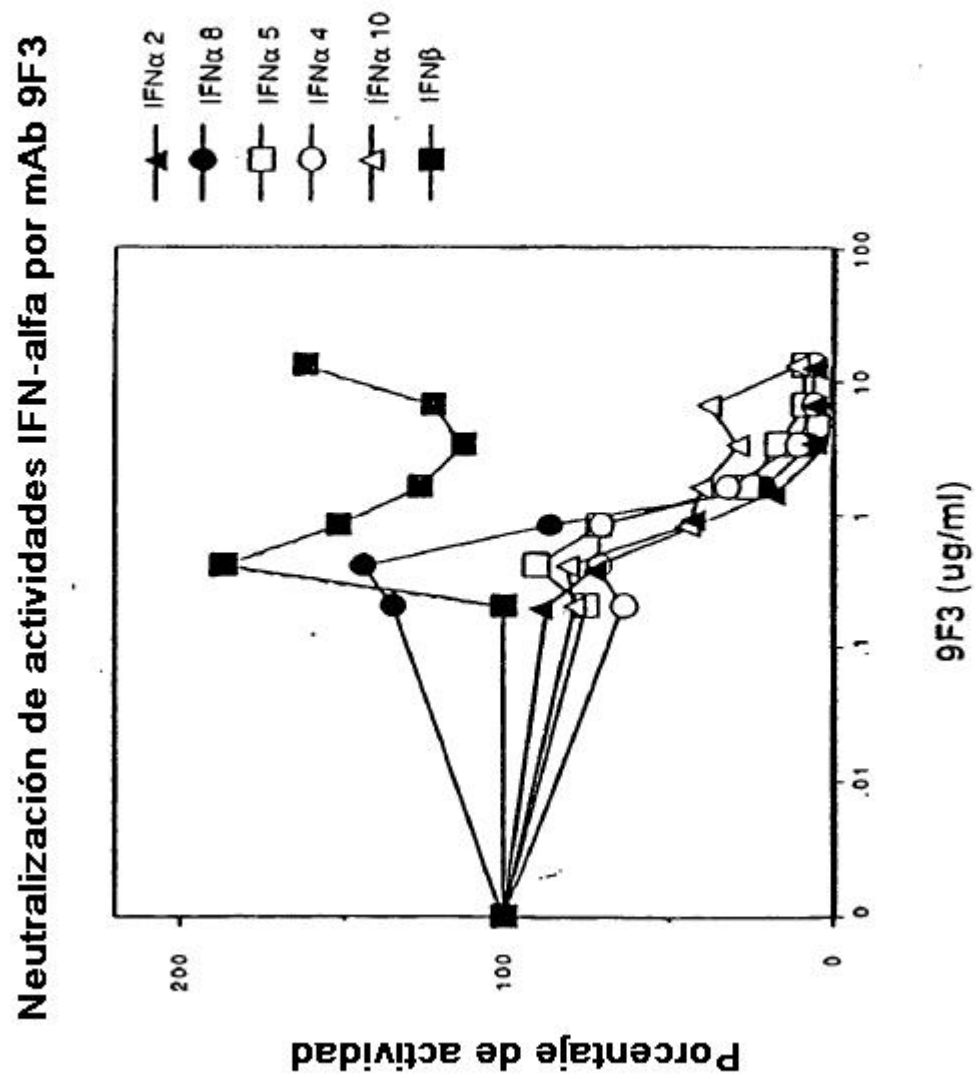


Figura 3

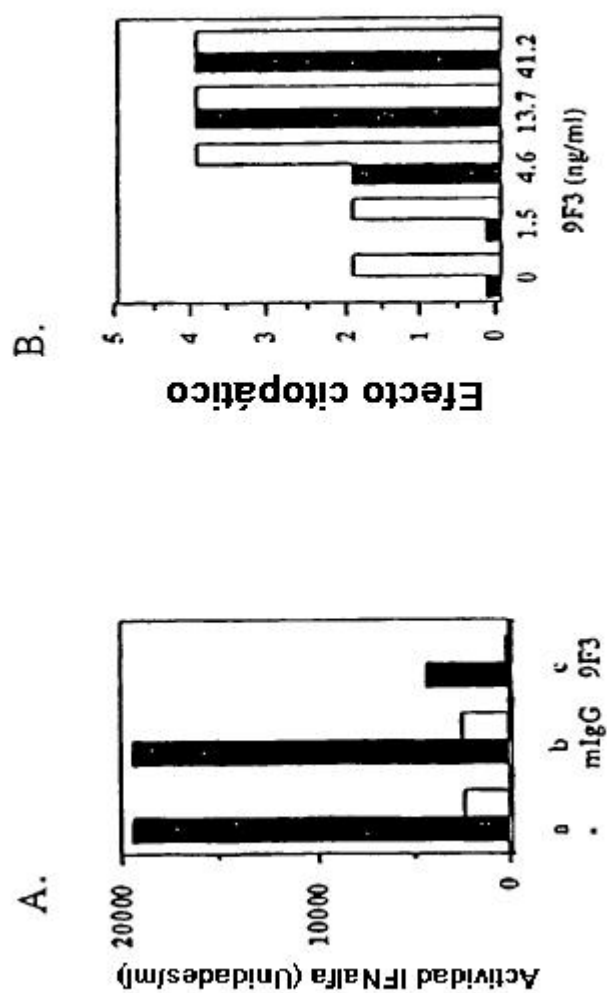


Figura 4

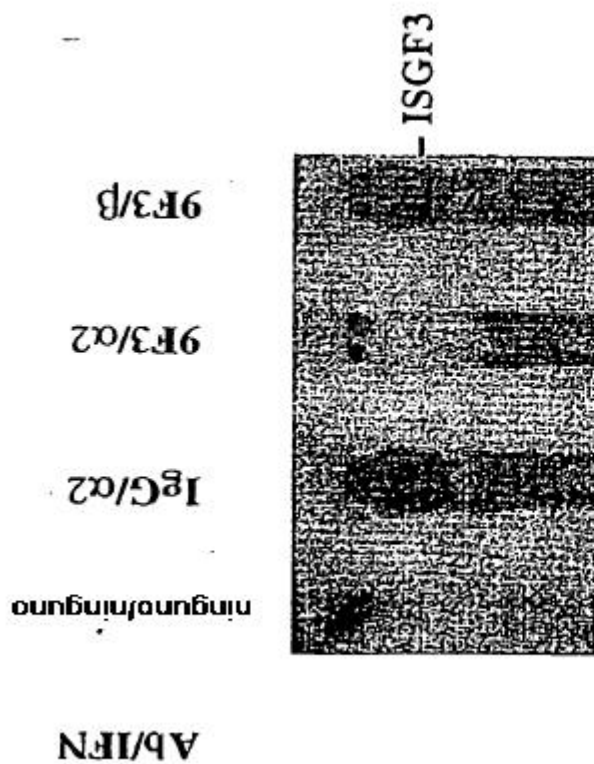


Figura 5A

Dominio ligero variable

	1	10	20	30	abcd	40
murino:	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKVLIS					
	** * ** * * * *					
V13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKVLIS					
	* * * * *					
hukI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SN---YLA WYQQKPGKAPKLLIY					

	50	60	70	80	90	
murino	YASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEGDTATYFCQHSWGIPRTF					
	* * * * *					
V13	YASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSWGIPRTF					
	* * * * *					
hukI	AASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYNSLPWTF					

	100					
murino	GAGTKLELRRAV					
	* * * *					
V13	GQGTKVEIKRTV					
hukI	GQGTKVEIKRTV					

Figura 5B

Dominio pesado variable

	1	10	20	30	40	
murino	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYIIHWVKQGHGRSLEWIG					
	** ** * * *** *					
V13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYIIHWVRQAPGKGLEWVA					
	* * * * *					
huIII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA					

	50	a	60	70	80	abc
murino	SINPDYDITNYNQRFKGGKATLTLDKSSRTAYLELRSLTSEDSAVYYCAS					
	* * * * *					
V13	SINPDYDITNYNQRFKGRFTISLDKSKRTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAS					
	* * * * * * * * * * * * * *					
huIII	VISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR					

	100					
murino	WISDFFDYWGQGTTLMVSAAS					
	* * * *					
V13	WISDFFDYWGQGTTLVTVSSAS					

huIII	GRVGYYDYWGQGTTLVTVSSAS					

Figura 6

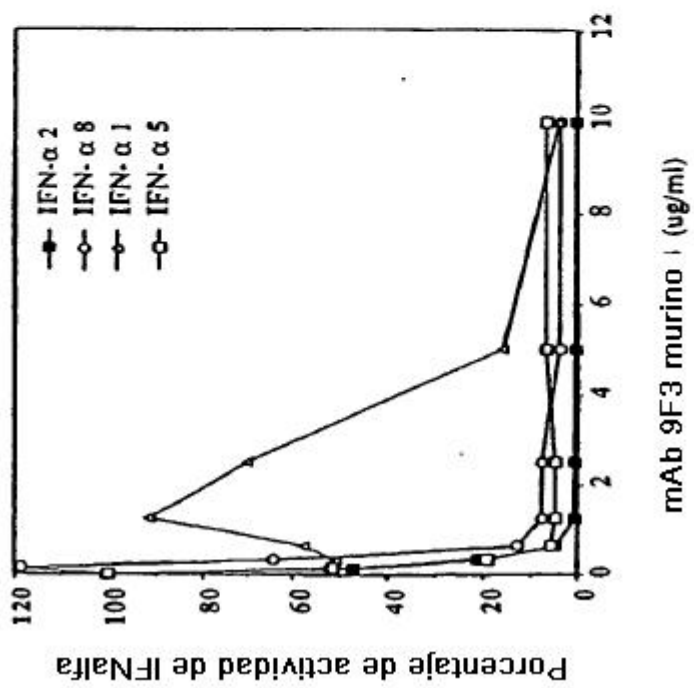
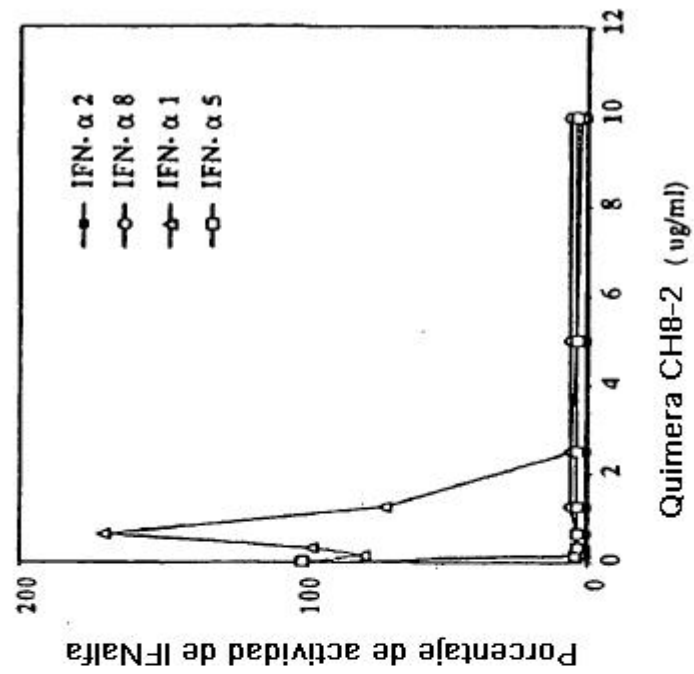


Figura 7

