

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 203**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06765483 .0**  
96 Fecha de presentación: **27.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1848744**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

54 Título: **Anticuerpos anti-interferón gamma humanos y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:  
**27.01.2005 US 648219 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.05.2012**

73 Titular/es:  
**NovImmune SA**  
**14 ch. Des AulxPlan-Les-Ouates**  
**1228 Geneva , CH**

72 Inventor/es:  
**FERLIN, Walter;**  
**FISCHER, Nicolas;**  
**ELSON, Greg y**  
**LEGER, Olivier**

74 Agente/Representante:  
**Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 381 203 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-interferón gamma humanos y métodos de uso de los mismos

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general a anticuerpos anti-interferón gamma completamente humanos así como a métodos para el uso de los mismos.

**10 Antecedentes de la invención**

El interferón gamma humano (IFN $\gamma$ , IFN-gamma) es una linfocina producida por linfocitos-T activados y células citotóxicas naturales. Manifiesta actividades antiproliferativas, antivirales e inmunomoduladoras y se une al IFN $\gamma$ -R, un receptor heterodimérico en la mayoría de las células primarias del sistema inmunitario, y desencadena una cascada de eventos que llevan a la inflamación. Se sabe que la actividad antiviral e inmunomoduladora del IFN $\gamma$  tiene efectos beneficiosos en varios estados clínicos. Sin embargo, hay muchos entornos clínicos en los que se sabe que la actividad del IFN $\gamma$  tiene efectos perjudiciales. Por ejemplo, las enfermedades autoinmunitarias están asociadas con niveles altos de IFN $\gamma$  en la sangre y tejido enfermo de pacientes autoinmunes. La actividad del IFN $\gamma$  también se ha relacionado con estados patológicos tales como caquexia y choque séptico.

El documento WO2004/035747 da a conocer anticuerpos humanos que inhiben la actividad del IFN $\gamma$ .

Por consiguiente, existe la necesidad de terapias que se dirijan a la actividad del IFN $\gamma$ .

**25 Sumario de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos específicamente contra el interferón gamma (IFN $\gamma$ , también denominado en el presente documento IFN-gamma) como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos monoclonales incluyen NI-0501; AC1.2R3P2\_A6 (también denominado en el presente documento "A6"); AC1.2R3P2\_B4 (también denominado en el presente documento "B4"); AD1.4R4P1\_B9 (también denominado en el presente documento "B9"); AD1.4R4P2\_C9 (también denominado en el presente documento "C9"); AC1.4R4P2\_C10 (también denominado en el presente documento "C10"); AC1.2R3P7\_D3 (también denominado en el presente documento "D3"); AD1.2R2P2\_D6 (también denominado en el presente documento "D6"); AC1.2R2P2\_D8 (también denominado en el presente documento "D8"); AD1.3R3P6\_E1 (también denominado en el presente documento "E1"); AD1.3R3P5\_F8 (también denominado en el presente documento "F8"); AD1.3R3P6\_F9 (también denominado en el presente documento "F9"); AD1.4R4P2\_G7 (también denominado en el presente documento "G7"); AD1.1R3P3\_G9 (también denominado en el presente documento "G9"); y AD1.3R3P6\_G10 (también denominado en el presente documento "G10") descritos en el presente documento.

Un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu contiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 12, 20, 28, 36, 42, 51, 58, 63, 68, 75, 81, 88, 94 o 103 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 7, 15, 23, 31, 38, 47, 54, 60, 66, 71, 78, 83, 91, 96 o 105. Preferiblemente, las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); DGSSGWYVPHWF DP (SEQ ID NO:5); DHSSGWYVISGMDV (SEQ ID NO:13); DLTVGGPWYFFDY (SEQ ID NO:21); DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29); SNAMS (SEQ ID NO:43); TLTGSGGTAYYADSVKG (SEQ ID NO:44); GTELVGGLDN (SEQ ID NO:45); RSFDSGGSFEY (SEQ ID NO:64); VGSWYLEDYFDI (SEQ ID NO:69); GGNYGDFDYFDY (SEQ ID NO:76); y DFVVITSGNDY (SEQ ID NO:89); y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:8); EDNQRPS (SEQ ID NO:9); QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:16); EDNQRPS (SEQ ID NO:17); QSNDSNVV (SEQ ID NO:18); DDDQRPS (SEQ ID NO:25); QSYDSSNVV (SEQ ID NO:26); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:32); DDKRPS (SEQ ID NO:33); QSYDSNNLVV (SEQ ID NO:34); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:39); QSYDNSHWV (SEQ ID NO:40); TGSSGSIATNYVQ (SEQ ID NO:48); QSYDSNHHVV (SEQ ID NO:49); TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:55); QSYDSSNQEVV (SEQ ID NO:56); QSYDSNFWV (SEQ ID NO:61); TRSSGSIASNYVH (SEQ ID NO:72); QSSDTTYHGGVV (SEQ ID NO:73); QSYEGF (SEQ ID NO:79); TGRNGNIASNYVQ (SEQ ID NO:84); EDTQRPS (SEQ ID NO:85); QSSDSNRVL (SEQ ID NO:86); QSFDTNLVV (SEQ ID NO:92); AGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:97); QSYSYNNQVV (SEQ ID NO:98); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:106); EDNRRPS (SEQ ID NO:107). El anticuerpo se une al IFN $\gamma$ .

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu incluyen una región CDR1 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos SYAMS (SEQ ID NO: 3) o SNAMS (SEQ ID NO:43); una región CDR2 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4) o TLTGSGGTAYYADSVKG (SEQ ID NO:44), y una región CDR3 de V<sub>H</sub>

que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5); DHSSGWYVISGMDV (SEQ ID NO:13); DLTVGGPWYFDY (SEQ ID NO:21); DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29); GTELVGGGLDN (SEQ ID NO:45); RSFDSGGSFEY (SEQ ID NO:64); VGSWYLED FDI (SEQ ID NO:69); GGNYGDYFDYFDY (SEQ ID NO:76); y DFWVITSGNDY (SEQ ID NO:89).

5

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu incluyen una región CDR1 de V<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:8); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:16); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:32); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:39); TGSSGSIATNYVQ (SEQ ID NO:48); TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 55); TRSSGSIASNYVH (SEQ ID NO:72); TGRNGNIASNYVQ (SEQ ID NO:84); AGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:97) y TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:106); una región CDR2 de V<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en EDNQRPS (SEQ ID NO:9); EDNQRPS (SEQ ID NO:17); DDDQRPS (SEQ ID NO:25); DDKKRPS (SEQ ID NO:33); EDTQRPS (SEQ ID NO:85) y EDNRRPS (SEQ ID NO:107); y una región CDR3 de V<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en QSYDGSNRWM (SEQ ID NO: 10); QSNDSNVV (SEQ ID NO:18); QSYDSSNVV (SEQ ID NO:26); QSYDSNNLVV (SEQ ID NO:34); QSYDNSNHV (SEQ ID NO:40); QSYDSDNHV (SEQ ID NO:49); QSYDSSNQEVV (SEQ ID NO:56); QSYDSNNFWV (SEQ ID NO:61); QSSDTTYHGGVV (SEQ ID NO:73); QSYEGF (SEQ ID NO:79); QSSDSNRVL (SEQ ID NO:86); QSFDSTNLVV (SEQ ID NO:92); y QSYSYNNQVV (SEQ ID NO:98).

10

15

20

25

30

35

40

45

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu incluyen, por ejemplo, una región CDR1 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos SYAMS (SEQ ID NO:3) o SNAMS (SEQ ID NO:43); una región CDR2 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos AISGSGGSTYYADSVK (SEQ ID NO:4) o TLTGSGGTAYYADSV (SEQ ID NO:44); una región CDR3 de V<sub>H</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5); DHSSGWYVISGMDV (SEQ ID NO:13); DLTVGGPWYFDY (SEQ ID NO:21); DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29); GTELVGGGLDN (SEQ ID NO: 45); RSFDSGGSFEY (SEQ ID NO:64); VGSWYLED FDI (SEQ ID NO:69); GGNYGDYFDYFDY (SEQ ID NO:76); y DFWVITSGNDY (SEQ ID NO:89); una región CDR1 de V<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:8); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:16); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:32); TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:39); TGSSGSIATNYVQ (SEQ ID NO:48); TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 55); TRSSGSIASNYVH (SEQ ID NO:72); TGRNGNIASNYVQ (SEQ ID NO:94); AGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:97) y TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:106); una región CDR2 de V<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en EDNQRPS (SEQ ID NO:9); EDNQRPS (SEQ ID NO:17); DDDQRPS (SEQ ID NO:25); DDKKRPS (SEQ ID NO:33); EDTQRPS (SEQ ID NO:85) y EDNRRPS (SEQ ID NO:107); y una región CDR3 de V<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10); QSNDSNVV (SEQ ID NO:18); QSYDSSNVV (SEQ ID NO:26); QSYDSNNLVV (SEQ ID NO:34); QSYDNSNHV (SEQ ID NO:40); QSYDSDNHV (SEQ ID NO:49); QSYDSSNQEVV (SEQ ID NO:56); QSYDSNNFWV (SEQ ID NO:61); QSSDTTYHGGVV (SEQ ID NO:73); QSYEGF (SEQ ID NO:79); QSSDSNRVL (SEQ ID NO:86); QSFDSTNLVV (SEQ ID NO:92); y QSYSYNNQVV (SEQ ID NO:98).

La cadena pesada de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu se deriva de un gen V (variable) de línea germinal tal como, por ejemplo, el gen de línea germinal DP47 (IGHV3-23) (n.º de registro de GenBank M99660) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a la secuencia del gen humano de línea germinal DP47. La secuencia de ácido nucleico para el gen de línea germinal DP47 (IGHV 3-23) incluye, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico mostrada a continuación:

```
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGA (SEQ
ID NO: 99)
```

La cadena ligera de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu se deriva de un gen de línea germinal de región variable de cadena ligera lambda Ig tal como, por ejemplo, el IGLV6-57 o V1-22 (n.º de registro de GenBank Z73673) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a la secuencia del gen humano de línea germinal IGLV6-57. La secuencia de ácido nucleico para el gen de línea germinal IGLV6-57 incluye, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico mostrada a continuación:

50

```
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCTGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCATC
TCCTGCACCCGAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGC
CCGGGAGTTCACCCCACTGTGATCTATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCT
GATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGA
CTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATAGCAGCAATCA (SEQ
ID NO: 108)
```

En otro aspecto, la invención proporciona métodos de tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario al administrar un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu se usan para tratar, prevenir o aliviar un síntoma asociado con trastornos relacionados con el sistema inmunitario tales como enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, sarcoidosis, artritis reumatoide, vasculitis, dermatitis atópica y esclerosis múltiple secundaria progresiva. Opcionalmente, al sujeto se le administra adicionalmente un segundo agente tal como, pero sin limitarse a, un reactivo anticitocinas o antiquimiocinas que reconoce citocinas tales como interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31, y/o quimiocinas tales como MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, IP-10, ITAC, MIG, SDF y fractalcina.

El sujeto padece o está predispuesto a desarrollar un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

### 15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para las regiones variable ligera y variable pesada de los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu NI-0501 y AC1.2R3P2\_A6. La figura 1A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada de N1-0501, y la figura 1B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están subrayadas en la figura 1B. La figura 1C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera de N1-0501, y la figura 1D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1C. Las CDR están subrayadas en la figura 1D. La figura 1E representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada de AC1.2R3P2\_A6, y la figura 1F representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1E. Las CDR están subrayadas en la figura 1F. La figura 1G representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera de AC1.2R3P2\_A6, y la figura 1H representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1G. Las CDR están subrayadas en la figura 1H.

La figura 2 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para las regiones variable ligera y variable pesada del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu AC1.2R3P2\_B4. La figura 2A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, y la figura 2B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 2A. Las CDR están subrayadas en la figura 2B. La figura 2C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera, y la figura 2D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 2C. Las CDR están subrayadas en la figura 2D.

La figura 3 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para las regiones variable ligera y variable pesada del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu AD1.4R4P1\_B9. La figura 3A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, y la figura 3B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 3A. Las CDR están subrayadas en la figura 3B. La figura 3C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera, y la figura 3D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 3C. Las CDR están subrayadas en la figura 3D.

La figura 4 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para las regiones variable ligera y variable pesada del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu AD1.4R4P2\_C9. La figura 4A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, y la figura 4B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 4A. Las CDR están subrayadas en la figura 4B. La figura 4C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera, y la figura 4D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 4C. Las CDR están subrayadas en la figura 4D.

La figura 5 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para las regiones variable ligera y variable pesada del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu AC1.4R4P2\_C10. La figura 5A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, y la figura 5B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 5A. Las CDR están subrayadas en la figura 5B. La figura 5C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera, y la figura 5D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 5C. Las CDR están subrayadas en la figura 5D.

La figura 6 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para las regiones variable ligera y variable pesada del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu AC1.2R3P7\_D3. La figura 6A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, y la figura 6B representa la



subrayadas en la figura 14B. La figura 14C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera, y la figura 14D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 14C. Las CDR están subrayadas en la figura 14D.

5 La figura 15 es un gráfico que representa la inhibición de la expresión del gen indicador inducida por  $\text{IFN}\gamma$  usando extractos de scFv periplasmáticos. Los extractos de scFv cuantificados inhibieron el gen indicador inducido por  $\text{IFN}\gamma$  de una manera dependiente de la dosis. Por cada clon de scFv se sometieron a prueba diversas concentraciones (2,7, 0,68, 0,17, 0,043 y 0,011 nM) tal como se muestra mediante las columnas sobre cada nombre de clon (concentración decreciente de izquierda a derecha, véase también la tabla 3 más adelante).

10 En la figura 16, los paneles 1-12 son una serie de gráficos que representan la inhibición de la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en células de melanoma usando extractos de scFv. Los scFv completamente humanos purificados inhibieron la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en células de melanoma. Se representan los clones de scFv ( ) y el Acm de ratón anti- $\text{IFN}\gamma$  humano 16C3 (---).

15 En la figura 17, los paneles 1-7 son una serie de gráficos que representan la inhibición de la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en células de melanoma usando extractos de scFv que se reconstituyeron en una estructura principal de IgG completamente humana. Los Acm completamente de IgG purificados inhibieron la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en células de melanoma. Se representan los clones completamente de IgG (-x-), el Acm de ratón anti- $\text{IFN}\gamma$  humano 16C3 (-Δ-) y el anticuerpo de ratón anti- $\text{IFN}\gamma$  humano MAB285 (-●-) de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN).

20 La figura 18 es un gráfico que representa la afinidad del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu N1-0501 por el  $\text{IFN}\gamma$  humano.

25 La figura 19 es un gráfico que compara la actividad de los anticuerpos producidos por los clones A6 y N1-0501 (también denominados en el presente documento "A6 retromutado con respecto a la línea germinal" o "A6 retromutado").

30 La figura 20 es un gráfico que representa la actividad del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu N1-0501 sobre el  $\text{IFN}\gamma$  humano nativo.

Las figuras 21A-21F son una serie de gráficos que representan la unión del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu NI-0501 con  $\text{IFN}\gamma$  recombinante de diversas especies.

35 La figura 22 es un gráfico que representa la capacidad del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu NI-0501 para neutralizar la regulación por incremento del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  de macaco nativo.

40 La figura 23 es un gráfico que representa la capacidad del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu NI-0501 para bloquear la producción de IP-10 inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en sangre completa.

### Descripción detallada

45 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos contra el interferón gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) tal como se define en las reivindicaciones.

50 Los anticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma$ hu son, por ejemplo, inhibidores o antagonistas de  $\text{IFN}\gamma$  que modulan al menos una actividad biológica del  $\text{IFN}\gamma$ . Las actividades biológicas del  $\text{IFN}\gamma$  incluyen, por ejemplo, la unión al receptor de  $\text{IFN}\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ -R), la modulación, por ejemplo, reducción o inhibición, de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II en la superficie de una célula, y la modulación, por ejemplo, reducción o inhibición, de la proliferación celular. Por ejemplo, los anticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma$ hu inhiben completa o parcialmente la actividad del  $\text{IFN}\gamma$  bloqueando parcial o completamente la unión del  $\text{IFN}\gamma$  y el receptor de  $\text{IFN}\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ -R). Se considera que los anticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma$  inhiben completamente la actividad del  $\text{IFN}\gamma$  cuando el nivel de actividad del  $\text{IFN}\gamma$  en presencia del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu disminuye al menos un 95%, por ejemplo, un 96%, 97%, 98%, 99% o 100% en comparación con el nivel de actividad del  $\text{IFN}\gamma$  en ausencia de unión con un anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu descrito en el presente documento. Se considera que los anticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma$  inhiben parcialmente la actividad del  $\text{IFN}\gamma$  cuando el nivel de actividad del  $\text{IFN}\gamma$  en presencia del anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu disminuye menos de un 95%, por ejemplo, un 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% en comparación con el nivel de actividad del  $\text{IFN}\gamma$  en ausencia de unión con un anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ hu descrito en el presente documento.

60 Adicionalmente, los anticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma$ hu de la invención inhiben la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en células (véanse, por ejemplo, los ejemplos 4 y 5). Preferiblemente, los anticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma$ hu muestran una inhibición superior al 50% de la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en la línea celular de melanoma humano Me67.8 a una concentración de al menos 0,02 nM. Por ejemplo, los anticuerpos muestran una inhibición superior al 50% de la expresión del CMH clase II inducida por  $\text{IFN}\gamma$  en la línea celular Me67.8 a una concentración

en el intervalo de 0,022 nM a 0,044 nM, por ejemplo, a una concentración de 0,022 nM, 0,028 nM o 0,044 nM.

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu modulan una respuesta inmunitaria en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto humano. Preferiblemente, los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu modulan una respuesta inmunitaria adaptativa en un sujeto. Más preferiblemente, los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu modulan la respuesta inmunitaria celular o mediada por células, también conocida como tipo Th1 o respuesta mediada por Th1.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu descritos en el presente documento modulan, por ejemplo, reducen, inhiben o evitan, una respuesta inmunitaria mediada por Th1 exagerada, tal como una respuesta inmunitaria mediada por Th1 exagerada asociada con un trastorno autoinmunitario o inflamatorio tal como, por ejemplo, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, sarcoidosis, artritis reumatoide, vasculitis, dermatitis atópica y esclerosis múltiple secundaria progresiva. Tal como se usa en el presente documento, el término respuesta inmunitaria mediada por Th1 "exagerada" se refiere a la presencia de un nivel elevado de citocina(s) Th1, tales como IL-2, IL-3, TNF-alfa (TNF $\alpha$ ) e INF $\gamma$ , en un sujeto en comparación con el nivel de producción de citocina Th1 en un sujeto que no padece una enfermedad o trastorno asociado con una respuesta inmunitaria Th1 exagerada. Para clasificar una respuesta inmunitaria mediada por Th1 como una respuesta exagerada, se evalúa el nivel de una respuesta de producción de citocina Th1, por ejemplo, midiendo y analizando el nivel de citocinas secretadas usando una prueba de ELISA u otro ensayo.

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu que se describen en el presente documento modulan, por ejemplo, inhiben, reducen o evitan, el cambio de clase a un isotipo de IgG, tal como cambio de clase inducido por IFN $\gamma$ . Estos anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu modulan, por ejemplo, inhiben, evitan o reducen, una respuesta mediada por Th1 y reducen en consecuencia el cambio inducido por IFN $\gamma$ .

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu de la invención se produjeron inmunizando un animal con IFN $\gamma$ , tal como, por ejemplo, IFN $\gamma$  murino o humano (véase, por ejemplo, n.º de registro de GenBank X13274) o una variante, derivado o fragmento inmunogénico del mismo. Alternativamente, el animal se inmuniza con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica para IFN $\gamma$ , de modo que el IFN $\gamma$  se expresa y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Alternativamente, los anticuerpos se obtienen examinando una biblioteca que contiene secuencias de dominio de unión a antígenos o anticuerpos para su unión al IFN $\gamma$ . Esta biblioteca se prepara, por ejemplo, en bacteriófago como fusiones de péptidos o proteínas a una cubierta proteínica de bacteriófago que se expresa en la superficie de partículas de fago ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas de fago (por ejemplo, "biblioteca de presentación en fago").

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu de la invención incluyen, por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) que se muestran a continuación en la tabla 1, las CDR de la cadena ligera mostradas en la tabla 2, y combinaciones de las mismas.

**Tabla 1.** Secuencias de VH de clones de anticuerpos que se unen a y neutralizan el IFN $\gamma$

Nombre del clon	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH
NI-0501	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVRG (SEQ ID NO:4)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5)
AC1.2R3P2_A6	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	DGSSGYVPHWFDP (SEQ ID NO:5)
AC1.2R3P2_D8	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5)
AC1.4R4P2_C10	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5)
AC1R3P2_B4	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:1)	DHSSGWYVISG*HDV (SEQ ID NO:13)
AD14R4P1_B9	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	DLTVGGPWYFDY (SEQ ID NO:21)
AD1.3R3P5_F8	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	VGSWYLEDYFDI (SEQ ID NO: 69)
AD1.3R3P6_F9	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	GGNYGDYFDYFDY (SEQ ID NO:76)
AD1.3R3P6_E1	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	RSFDSGGSFY (SEQ ID NO: 64)
AD14R4P2_C9	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO: 29)
AD14R4P2_G7	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:4)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO: 29)
AD1.1R3P6_G10	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKVG	DGWNALGWLES (SEQ

		(SEQ ID NO:4)	ID NO: 29)
AD1R2P2_D6	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)	DGWNALGWLES (SEQ ID NO: 29)
AD1.1R3P3_G9	SYAMS (SEQ ID NO:3)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)	DFWVITSGNDY (SEQ ID NO: 89)
AC1.2R3P7_D3	SNAMS (SEQ ID NO:43)	TLTGSGGTAYYADSVEG (SEQ ID NO:44)	GTELVGGGLDN (SEQ ID NO: 45)

Tabla 2. Secuencias de VL de clones de anticuerpos que se unen a y neutralizan el IFN $\gamma$ 

Nombre del clon	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
NI-0501	TRSSGSIASNYV Q (SEQ ID NO:8)	EDNQRPS (SEQ ID NO:9)	QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10)
AC1.2R3P2_A6	TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:106)	EDNRRPS (SEQ ID NO:107)	QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10)
AC1.2R3P2_D8	TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSYDSNNFWV (SEQ ID NO: 61)
AC1.4R4P2_C10	TRSSGTIASNYVQ (SEQ ID NO:39)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSYDNSNHVV (SEQ ID NO: 40)
AC1R3P2_B4	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:16)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSNDSNVV (SEQ ID No: 18)
AD14R4P1_B9	TRSSGSIV SNYV Q (SEQ ID NO:8)	DDDQRPS (SEQ ID NO:25)	QSYDSSNVV (SEQ ID NO: 26)
AD1.3R3P5_F8	TRSSGSIASNYVH (SEQ ID NO:72)	EDNRRPS (SEQ ID NO:9)	QSSDTTYHGGVV SEQ ID NO:73)
AD1.3R3P6_F9	TRSSGSIASNYV Q (SEQ ID NO:16)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSYEGF (SEQ ID NO:79)
AD1.3R3P6_E1	TRSSGYIASSYV Q (SEQ ID NO:8)	EDDRRPS (SEQ ID NO:25)	QSYDDTTPWV (SEQ ID NO: 26)
AD1 4R4P2_C9	TRSGGSIGSYV Q (SEQ ID NO:32)	DDKKRPS (SEQ ID NO:33)	QSYDSNNLVV (SEQ ID NO: 34)
AD1 4R4P2_G7	TGRNGNIASNYVQ (SEQ ID NO:84)	EDNQRPS (SEQ ID NO:85)	QSSDSNRVL (SEQ ID NO: 86)
AD1 3R3P6_G10	AGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:97)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSYSYNNQVV (SEQ ID NO: 98)
AD1 R2P2_D6	TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 55)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSYDSSNQEVV (SEQ ID NO:56)
AD1.1R3P3_G9	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:16)	EDNRRPS (SEQ ID NO:9)	QSFDDSTNLVV (SEQ ID NO: 92)
AC1.2R3P7_D3	TGSSGSIATNYVQ (SEQ ID NO:46)	EDNQRPS (SEQ ID NO:17)	QSYDSDNHVV (SEQ ID NO:49)

- 5 Un anticuerpo monoclonal anti-IFN $\gamma$  a modo de ejemplo es el anticuerpo NI-0501 descrito en el presente documento. El anticuerpo NI-0501 es una versión retromutada del anticuerpo AC1.2R3.P2\_A6. Tal como se usa en el presente documento, el término "retromutada" se refiere a mutar un nucleótido o residuo de aminoácido de vuelta al nucleótido o residuo que se encuentra en la ubicación correspondiente en la secuencia de línea germinal. El anticuerpo NI-0501 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:2) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:1, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:7) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:6 (figuras 1A-1D).

15 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tal como se definió por Chothia *et al.* y E.A. Kabat *et al.* están subrayados en las figuras 1B y 1D. (véase Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo A6 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo A6 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:8); EDNQRPS (SEQ ID NO: 9); y QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10).

20 Otro anticuerpo monoclonal anti-IFN $\gamma$  a modo de ejemplo es el anticuerpo AC1.2R3.P2\_A6 ("A6") descrito en el presente documento. El anticuerpo A6 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:103) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:102, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:105) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:104 (figuras 1E-1H). Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tal como se definen por Chothia *et al.* y E.A. Kabat *et al.* están subrayados en las figuras 1F y 1H. (Véase Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, US Department of Health

and Human Services, US Government Printing Office (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo A6 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGSSGWYVPHWFD (SEQ ID NO:5). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo A6 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:106); EDNRRPS (SEQ ID NO:107); y QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10).

El anticuerpo AC1.2R3P2\_B4 (también denominado en el presente documento "B4") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:12) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 15) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:14 (figuras 2A-2D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 2B y 2D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo B4 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DHSSGWESGMDV (SEQ ID NO:13). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo B4 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:16); EDNQRP (SEQ ID NO:17); y QSNDSNVV (SEQ ID NO:18).

El anticuerpo AD1.4R4P1\_B9 (también denominado en el presente documento "B9") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:20) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 23) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:22 (figuras 3A-3D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 3B y 3D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo B9 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DLTGGPWYFDY (SEQ ID NO:21). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo B9 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8); DDDQRPS (SEQ ID NO:25); y QSYDSSNVV (SEQ ID NO:26).

El anticuerpo AD1.4R4P2\_C9 (también denominado en el presente documento "C9") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:28) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:27, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:31) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:30 (figuras 4A-4D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 4B y 4D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo C9 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo C9 tienen las siguientes secuencias: TRSGSIGSYVQ (SEQ ID NO:32); DDKRPS (SEQ ID NO:33); y QSYDSNNLW (SEQ ID NO:34).

El anticuerpo AC1.4R4P2\_C10 (también denominado en el presente documento "C10") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:36) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:35, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:38) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:37 (figuras 5A-5D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 5B y 5D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo C10 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGSSGWYVPHWF DP (SEQ ID NO:5). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo C10 tienen las siguientes secuencias: TRSSGTIASNYVQ (SEQ ID NO:39); EDNQRP (SEQ ID NO:17); y QSYDNSHWV (SEQ ID NO:40).

El anticuerpo AC1.2R3P7\_D3 (también denominado en el presente documento "D3") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:42) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:41, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:47) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:46 (figuras 6A-6D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 6B y 6D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo D3 tienen las siguientes secuencias: SNAMS (SEQ ID NO:43); TLTGSGGTAYYADSV (SEQ ID NO:44); y GTELVGGGLDN (SEQ ID NO:45). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo D3 tienen las siguientes secuencias: TGSGGSATNYVQ (SEQ ID NO:48); EDNQRP (SEQ ID NO:17) y QSYDSDNHHV (SEQ ID NO:49).

El anticuerpo AD1.2R2P2\_D6 (también denominado en el presente documento "D6") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:51) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:50, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:54) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:53 (figuras 7A-7D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 7B y 7D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo D6 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo D6 tienen las siguientes secuencias: TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:55); EDNQRP (SEQ ID NO:17); y QSYDSSNQEVV (SEQ ID NO:56).

El anticuerpo AC1.2R2P2\_D8 (también denominado en el presente documento "D8") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:58) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:57, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:60) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:59 (figuras 8A-8D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 8B y 8D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo D8 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGSSGWYVPHWF DP

(SEQ ID NO:5). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo D8 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8); EDNQRPS (SEQ ID NO:17); y QSYDSNNFWV (SEQ ID NO:61).

5 El anticuerpo AD1.3R3P6\_E1 (también denominado en el presente documento "E1") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:63) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:62, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 66) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:65 (figuras 9A-9D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 9B y 9D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo E1 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y RSFDSGGSFY (SEQ ID NO:64). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo E1 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8); DDDQRPS (SEQ ID NO:25); y QSYDSSNVV (SEQ ID NO:26).

15 El anticuerpo AD1.3R3P5\_F8 (también denominado en el presente documento "F8") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:68) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:67, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 71) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:70 (figuras 10A-10D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 10B y 10D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo F8 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y VGSWYLEDY (SEQ ID NO:69). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo F8 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8); EDNRRPS (SEQ ID NO:9); y QSSDTTYHGGVV (SEQ ID NO:73).

25 El anticuerpo AD1.3R3P6\_F9 (también denominado en el presente documento "F9") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:75) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:74, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 78) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:77 (figuras 11A-11D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 11B y 11D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo F9 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y GGNYGDYFDYFDY (SEQ ID NO:76). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo F9 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8); EDNQRPS (SEQ ID NO:17); y QSYEGF (SEQ ID NO:79).

30 El anticuerpo AD1.4R4P2\_G7 (también denominado en el presente documento "G7") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:81) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:80, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:83) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:82 (figuras 12A-12D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 12B y 12D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo G7 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo G7 tienen las siguientes secuencias: TGRNGNIASNYVQ (SEQ ID NO:84); EDTQRPS (SEQ ID NO:85); y QSSDSNRVL (SEQ ID NO:86).

40 El anticuerpo AD1.1R3P3\_G9 (también denominado en el presente documento "G9") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:88) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:87, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:91) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:90 (figuras 13A-13D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 13B y 13D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo G9 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DFWVITSGNDY (SEQ ID NO:89). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo G9 tienen las siguientes secuencias: TRSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:8); EDNRRPS (SEQ ID NO:9); y QSFDSTNLVV (SEQ ID NO:92).

50 El anticuerpo AD1.3R3P6\_G10 (también denominado en el presente documento "G10") incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:94) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:93, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:96) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:95 (figuras 14A-14D). Los aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por Chotlia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están subrayados en las figuras 14B y 14D. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo G10 tienen las siguientes secuencias: SYAMS (SEQ ID NO:3); AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4); y DGWNALGWLES (SEQ ID NO:29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo G10 tienen las siguientes secuencias: AGSSGSIVSNYVQ (SEQ ID NO:97); EDNQRPS (SEQ ID NO:17); y QSYSYNNQW (SEQ ID NO:98).

60 Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu de la invención también incluyen anticuerpos que incluyen una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada que tiene una identidad de al menos el 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% o superior con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 12, 20, 28, 36, 42, 51, 58, 63, 68, 75, 81, 88, 94 ó 103 (figuras 1-14) y/o un aminoácido variable de cadena ligera que tiene una identidad de al menos el 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% o superior con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 38, 47, 54, 60, 66, 71, 78, 83, 91, 96 ó 105 (figuras 1-14).

65 Alternativamente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que NI-0501, A6, B4, B9, C9, C10, D3, D6, D8, E1, F8, F9, G7, G9 o G10.

A menos que se definan de otra manera, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular e hibridación y química de oligo- o polinucleótidos y proteínas descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Tal como se utilizan según la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que se une específicamente (reacciona de manera inmunitaria con) un antígeno. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$  y  $F_{(ab)2}$ , de cadena simple, policlonales, monoclonales, quiméricos, y una biblioteca de expresión de  $F_{ab}$ . Con “unirse específicamente” o “reacciona de manera inmunitaria con” quiere decirse que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (es decir, se une) con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ( $K_d > 10^{-6}$ ) con otros polipéptidos.

Se conoce que la unidad estructural básica de anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La parte aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase en general, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ea., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión a anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal” (Acm) o “composición de anticuerpo monoclonal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena ligera único y un producto génico de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los Acm contienen un sitio de unión a antígenos que puede reaccionar de manera inmunitaria con un epítopo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por el mismo.

En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de seres humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases tienen también subclases, tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> y otros. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

El término “sitio de unión a antígenos” o “parte de unión” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígenos está formado por residuos de aminoácido de las regiones variables (“V”) N-terminales de las cadenas pesada (“H”) y ligera (“L”). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas “regiones hipervariables”, se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como “regiones de entramado”, o “FR”. Por tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas de manera relativa entre sí en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígenos. La superficie de unión a antígenos es

complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las regiones pesada y ligera se denominan “regiones determinantes de complementariedad”, o “CDR”. La asignación de los aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Protein of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que puede unirse de manera específica a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de células T. El término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que puede unirse de manera específica a una inmunoglobulina o un receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es  $\leq 1 \mu\text{M}$ ; preferiblemente  $\leq 100 \text{ nM}$  y lo más preferiblemente  $\leq 10 \text{ nM}$ .

Tal como se usa en el presente documento, los términos “unión inmunológica” y “propiedades de unión inmunológica” se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológicas puede expresarse en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, representando una menor  $K_d$  una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se cuantifican usando métodos muy conocidos en la técnica. Un método de este tipo implica medir las tasas de formación y disociación del complejo sitio de unión a antígeno/antígeno, dependiendo esas tasas de las concentraciones de los componentes del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen por igual en la tasa en ambos sentidos. Por tanto, tanto la “constante de tasa de unión” ( $K_{on}$ ) como la “constante de tasa de separación” ( $K_{off}$ ) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361:186-87 (1993)). La razón de  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación  $K_d$ . (Véase, en general, Davies *et al.* (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a un epítipo de  $\text{IFN}\gamma$  cuando la constante de unión de equilibrio ( $K_d$ ) es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , preferiblemente  $\leq 100 \text{ nM}$ , más preferiblemente  $\leq 10 \text{ nM}$ , y lo más preferiblemente  $\leq$  de  $100 \text{ pM}$  a aproximadamente a  $1 \text{ pM}$ , medida mediante ensayos tales como ensayos de unión a radioligandos o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin excesiva experimentación, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal humano de la invención (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal NI-0501, A6, B4, B9, C9, C10, D3, D6, D8, E1, F8, F9, G7, G9 o G10) estableciendo si el primero impide al último unirse a un polipéptido antigénico de  $\text{IFN}\gamma$ . Si el anticuerpo monoclonal humano que está sometiéndose a prueba compite con un anticuerpo monoclonal humano de la invención, tal como se muestra mediante una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal humano de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o a uno estrechamente relacionado. Otra manera de determinar si el anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es preincubar el anticuerpo monoclonal humano de la invención con el polipéptido antigénico de  $\text{IFN}\gamma$  con el que es normalmente reactivo, y luego añadir el anticuerpo monoclonal humano que está sometiéndose a prueba para determinar si se inhibe la capacidad del anticuerpo monoclonal humano que está sometiéndose a prueba para unirse al polipéptido antigénico de  $\text{IFN}\gamma$ . Si el anticuerpo monoclonal humano que está sometiéndose a prueba se inhibe entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epitópica, o una funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Se usan diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína tales como una proteína  $\text{IFN}\gamma$ , o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de la misma. (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., incorporado en el presente documento como referencia). Anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en las que la secuencia entera tanto de la cadena ligera y como de la cadena pesada, incluyendo las CDR, proceden de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan “anticuerpos humanos” o “anticuerpos completamente humanos” en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales humanos se preparan, por ejemplo, usando los procedimientos descritos en los ejemplos proporcionados anteriormente. Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse usando una técnica de trioma; la técnica de hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, *et al.*, 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.*, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Less, Inc., págs. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden utilizarse y pueden producirse usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Los anticuerpos se purifican mediante técnicas muy conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando una proteína A o una proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG del suero inmunitario. Posterior, o alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, puede inmovilizarse en una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de inmovilización de afinidad. La purificación de inmunoglobulinas se comenta, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, vol. 14, n.º 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

Es deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora para mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo para tratar enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. Por ejemplo, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación del enlace disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado, puede tener capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por complemento aumentada y citotoxicidad celular dependiendo de antígeno (ADCC). (Véase Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, un anticuerpo puede modificarse mediante ingeniería para que tenga regiones Fc duales y pueda así tener lisis de complementos mejorada y capacidades de ADCC. (Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

La invención también incluye fragmentos de IFN $\gamma$ hu F<sub>v</sub>, F<sub>ab</sub>, F<sub>ab'</sub> y F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>, anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu de cadena sencilla, anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu biespecíficos y anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu heretoconjugados.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para IFN $\gamma$ . La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor.

En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de inmunoglobulinas de cadenas pesada y ligera, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se dan a conocer en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican para las fusiones de 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 adecuado. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse mediante ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejación de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se convierte después en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Adicionalmente, los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado podía unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos humanos citotóxicos contra dianas de tumor de mama humanas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron a la región bisagra para formar monómeros y luego volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) mediante un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento se ven obligados a aparearse con los dominios complementarios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígenos. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en la proteína IFN $\gamma$ . Alternativamente, una rama anti-antigénica de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con una rama que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo, CD2, IFN $\gamma$ , CD28 o B7), o receptores Fc para IgG (Fc $\gamma$ R), tales como Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (IFN $\gamma$ 2) y Fc $\gamma$ RIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos tienen una rama de unión a antígenos y una rama que se une a un agente citotóxico o un quelante radionúclido, tales como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une el antígeno proteico descrito en el presente documento y adicionalmente se une a un factor tisular (TF).

Anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigirse a células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente estadounidense n.º 4.676.980), y para el tratamiento de una infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquéllos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.676.980.

La descripción también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (por ejemplo, un radioconjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re.

Se preparan conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*,

Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. (Véase el documento WO94/11026).

- 5 Los expertos habituales en la técnica reconocerán que una gran variedad de posibles restos pueden acoplarse a los anticuerpos resultantes o a otras moléculas de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewes, Jr (eds), Carger Press, Nueva York, (1989).
- 10 El acoplamiento se logra mediante cualquier reacción química que una las dos moléculas siempre que el anticuerpo y el otro resto conserven sus respectivas actividades. Esta unión puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión de afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. La unión preferida es, sin embargo, la unión covalente. La unión covalente se logra ya sea por condensación directa de cadenas laterales existentes o por la incorporación de moléculas de puente externas. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas proteicas, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehídos, diazobencenos y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino que, más bien, es a modo de ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véase Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). Ligadores preferidos se describen en la bibliografía. (Véase, por ejemplo, Ramakreshnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida). Véase también la patente estadounidense n.º 5.030.719, que describe el uso del derivado de acetilhidrazida halogenada acoplado a un anticuerpo por medio de un ligador de oligopéptido. Los ligadores particularmente preferidos incluyen: (i) EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida); (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., cat. (21558G)); (iii) SPDP ([3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de 6-succinimidilo (Pierce Chem. Co., n.º de cat. 21651G)); (iv) Sulfo-LC-SPDP ([3-(2-piridilditio)-propionamido]hexanoato de 6-sulfosuccinimidilo (Pierce Chem. Co. n.º de Cat. 2165- G)); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida: Pierce Chem. Co., n.º de cat. 24510) conjugada con EDC.

Los ligadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, conduciendo así a conjugados con propiedades fisicoquímicas que difieren. Por ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los ésteres de NHS que contienen ligadores son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el ligador SMPT contiene un enlace disulfuro impedido estéricamente y puede formar conjugados con estabilidad aumentada. Los enlaces disulfuro, son en general menos estables que otros enlaces porque el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado menos conjugado disponible. Las sulfo-NHS, en particular, pueden mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tal como EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

El término "polinucleótido aislado" tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de origen genómico, de ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, en virtud de cuyo origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con toda o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia en el presente documento significa una proteína de ADNc, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, en virtud de cuyo origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a proteínas nativas, fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptido. Por tanto, los fragmentos de proteína nativa, y análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos preferidos según la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana representadas mediante las figuras 1B, 2B, 3B y 4B y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera humana representadas mediante las figuras 1D, 2D, 3D y 4D, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa, y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos.

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

origen natural.

La expresión “unido operativamente” tal como se usa en el presente documento se refiere a que las posiciones de componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia de control “unida operativamente” a una secuencia codificante está ligada de tal modo que una expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “secuencia de control” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes con las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped en procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, sitios de unión ribosómicos y una secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de componente de fusión. El término “polinucleótido” tal como se hace referencia en el presente documento significa un boro polimérico de nucleótidos que tienen al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN monocatenario y bicatenario.

El término oligonucleótidos al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural y modificados unidos mediante uniones de oligonucleótidos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud y lo más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o de 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son habitualmente monocatenarios, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos o bien sentido o bien antisentido.

La expresión “nucleótidos que se producen de manera natural” a la que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados” al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “uniones de oligonucleótidos” al que se hace referencia en el presente documento incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotiato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforimidato, y similares. Véase por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec *et al.* patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para su detección, si se desea.

La expresión “hibridar selectivamente” a la que se hace referencia en el presente documento significa unirse de manera detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos según la invención se hibridan selectivamente a cadenas de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las cantidades apreciables de uniones detectables a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectiva tal como se conocen en la técnica y se comentan en el presente documento. Generalmente, la homología de la secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos el 80%, y más normalmente con homologías preferiblemente crecientes de al menos el 85%, 90%, 95%, 99% y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando se alinean las dos secuencias para un apareamiento máximo. Se prefieren huecos (en cualquiera de las dos secuencias que están apareándose) que permiten maximizar longitudes de apareamiento de huecos de 5 o menos, prefiriéndose más 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptido derivadas de las mismas que tienen al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como se usa este término en el presente documento, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización de hueco de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y suplemento 2 a este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos tienen una identidad mayor que o igual al 50% idénticos cuando se alinean óptimamente usando el programa ALIGN. El término “corresponde a” se usa en el presente documento para decir que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada de manera evolutiva) a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptido es idéntica a una secuencia de polipéptido de referencia. Por el contrario, el término “complementario a” se usa en el presente documento para explicar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. Como ilustración,

la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

5 Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótido o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subgrupo de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de una secuencia génica o de ADNc de longitud completa proporcionada en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia génica o de ADNc completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos, frecuentemente una longitud de al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos, y a menudo una longitud de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Puesto que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (por ejemplo, una parte de la secuencia completa de polinucleótido o aminoácidos) que es similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, normalmente se realizan comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas comparando secuencias de las dos moléculas a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en la que puede compararse una secuencia de polinucleótido o secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en la que la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones, y similares (por ejemplo, huecos) del 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics versión 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), paquetes de software MacVector o Geneworks), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, dando como resultado el mayor porcentaje de homología a lo largo de la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

35 El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótido o aminoácidos son idénticas (es decir, nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece un residuo o base de ácido nucleico idéntico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia de polinucleótido o aminoácidos, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90 al 95%, más habitualmente una identidad de secuencia de al menos el 99% en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótido (6 de aminoácido), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótido (de 8 a 16 de aminoácido), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que ascienden al 20% o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

55 Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaciones siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2da Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Los esteroisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetil-lisina,  $\epsilon$ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina,  $\sigma$ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, el sentido hacia la izquierda es el sentido amino-terminal y el sentido hacia la derecha es el sentido carboxi-terminal, según el uso y la convención habituales.

65 De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo hacia la izquierda de secuencias de polinucleótidos monocatenarios es el extremo 5', el sentido hacia la izquierda de secuencias de polinucleótidos bicatenarios se denomina el sentido 5'. El sentido de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se

denominan regiones de secuencia de dirección de transcripción en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en sentido de 5'", las regiones de secuencia en la cadena del ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

5

Tal como se aplicó a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de huecos por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 95%, y lo más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 99%.

10

Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservativas de aminoácidos.

15

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos preferidas son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

20

25

Tal como se describió en el presente documento, se contempla que las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas están abarcadas en la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos se mantengan al menos al 75%, más preferiblemente al menos al 80%, 90%, 95%, y lo más preferiblemente al 99%. En particular, los reemplazos conservativos de aminoácidos se contemplan. Los reemplazos conservativos son aquéllos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos apolares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que es la familia de hidroxilo alifático; (ii) asparagina y glutamina, que es la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que es la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano, y tirosina, que es la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la unión o propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de un sitio de entramado. Si un aminoácido cambia los resultados en un péptido funcional puede determinarse fácilmente sometiendo a ensayo la actividad específica del derivativo de polipéptido. Los ensayos se describen en detalle en el presente documento. Pueden prepararse fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas por los expertos habituales en la técnica. Los extremos amino- y carboxi-terminal preferidos de fragmentos o análogos aparecen cerca de los límites de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante comparación de los datos de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación computerizados para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas predichos que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Por tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencias y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la presente invención.

30

35

40

45

50

55

Sustituciones de aminoácidos preferidas son aquéllas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión, y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta a la secuencia peptídica que se produce de manera natural. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de un solo aminoácido o de múltiples aminoácidos (preferiblemente sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia que se produce de manera natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares. Una sustitución conservativa de aminoácido no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia original, ni perturbar otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en Proteins,

60

65

Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* Nature 354:105 (1991).

5 El término "fragmento de polipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una deleción aminoterminal y/o carboxiterminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que se produce de manera natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos tienen normalmente una longitud de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, habitualmente una longitud de al menos 50 aminoácidos, y aún más preferiblemente una longitud de al menos 70 aminoácidos. El término "análogo" tal como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tienen identidad sustancial a una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a IFN $\gamma$ , en condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión a IFN $\gamma$  apropiada, o (3) capacidad para inhibir el crecimiento de células que expresan IFN $\gamma$  *in vitro* o *in vivo*. Normalmente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución (o adición o deleción) conservativa de aminoácido con respecto a la secuencia que se produce de manera natural. Los análogos tienen normalmente una longitud de al menos 20 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 50 aminoácidos o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido que se produce de manera natural de longitud total.

20 Se usan comúnmente análogos peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber y Freidinger TINS pág. 392 (1955); y Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular computerizado. Los miméticos de péptidos que son similares estructuralmente a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen una o más uniones peptídicas reemplazadas opcionalmente por una unión seleccionada del grupo que consiste en: --CH<sub>2</sub>NH--, -CH<sub>2</sub>S-, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--, --CH=CH-- (cis y trans), --COCH<sub>2</sub>--, CH(OH)CH<sub>2</sub>-- y -CH<sub>2</sub>SO--, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse polipéptidos impedidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

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

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "marca" o "marcado" se refiere a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotínulo que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la marca o marcador puede ser también terapéutico. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y pueden usarse. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos biotínulo, quimioluminiscentes, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítopos). En algunas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. El término "fármaco o agente farmacéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

Otros términos químicos en el presente documento se usan según el uso convencional en la técnica, tal como se ejemplifican en The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

El término "agente antineoplásico" se usa en el presente documento para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o progresión de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie

predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

5

Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80% de todas las especies macromoléculas presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, 90%, 95% y el 99%. Más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una especie macromolecular individual.

10

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios. El término sujeto incluye seres humanos y otros mamíferos.

### 15 Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Se genera un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ <sub>hu</sub>, por ejemplo, usando los procedimientos descritos en los ejemplos proporcionados a continuación. Se genera un anticuerpo IgG IFN $\gamma$ <sub>hu</sub>, por ejemplo, convirtiendo un clon de scFv en un formato de IgG (véase, por ejemplo, el ejemplo 6). Alternativamente, tal anticuerpo anti-IFN $\gamma$ <sub>hu</sub> se desarrolla, por ejemplo, usando métodos de presentación en fase usando anticuerpos que contienen solo secuencias humanas. Tales enfoques se conocen bien en la técnica, por ejemplo, en el documento WO92/01047 y la patente estadounidense n.º 6.521.404, que se incorpora por el presente documento como referencia. En este enfoque, se examina una biblioteca combinatoria de fagos que llevan pares aleatorios de cadenas ligeras y pesadas usando una fuente natural o recombinante de IFN $\gamma$  o fragmentos del mismo.

20

25

Se produce un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ <sub>hu</sub> mediante un procedimiento en el que al menos una etapa del procedimiento incluye inmunizar un animal transgénico, no humano con proteína IFN $\gamma$  humana. Algunos de los loci de cadenas endógenas pesadas y/o ligeras kappa de este animal xenogénico no humano han sido deshabilitadas y no pueden producir la redistribución requerida para generar genes que codifican para inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno. Además, al menos un locus de cadena pesada humana y al menos un locus de cadena ligera humana se han transfectedo de manera estable en el animal. Por tanto, en respuesta a un antígeno administrado, los loci humanos se redisponen para proporcionar genes que codifican para regiones variables humanas inmunoespecíficas para el antígeno. Tras la inmunización, por tanto, el ratón xenogénico produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas.

30

35

Se conoce bien en la técnica una variedad de técnicas para producir animales xenogénicos no humanos. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.º 6.075.181 y n.º 6.150.584. Mediante una estrategia, los genes de inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras xenogénicos (humanos) se introducen en la línea germinal del huésped (por ejemplo, esperma u ovocitos) y, en etapas separadas, los genes correspondientes del huésped se vuelven no funcionales mediante inactivación usando recombinación homóloga. Los genes de inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras humanas se reconstruyen en un microorganismo eucariota o procariota apropiado, y los fragmentos resultantes de ADN se introducen en el huésped apropiado, por ejemplo, los pronúcleos de ovocitos de ratón fertilizados o células madre embrionarias. La inactivación de los loci de inmunoglobulinas del huésped endógenos se logra mediante perturbación dirigida de los loci apropiados mediante recombinación homóloga en las células del huésped, particularmente células madre embrionarias o pronúcleos de ovocitos de ratón fertilizados. La perturbación dirigida puede involucrar la introducción de una lesión o delección en el locus diana, o la delección dentro del locus diana acompañada por la inserción en el locus, por ejemplo, la inserción de un marcador seleccionable. En el caso de células madre embrionarias, se generan animales quiméricos que se derivan en parte de las células madre embrionarias modificadas y pueden transmitir las modificaciones genéticas a través de la línea germinal. El apareamiento de huéspedes con loci de inmunoglobulinas humanas introducidos en cepas con loci endógenos inactivados producirá animales cuya producción de anticuerpos es puramente xenogénica, por ejemplo, humana.

40

45

50

En una estrategia alternativa, se usan al menos partes de los loci de inmunoglobulinas humanas de cadenas pesadas y ligeras para reemplazar directamente los loci de inmunoglobulina endógenos correspondientes mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias. Esto da como resultado la inactivación simultánea y el reemplazo de la inmunoglobulina endógena. Esto está seguido por la generación de animales quiméricos en los que las células derivadas de células madre embrionarias pueden contribuir a las líneas germinales.

55

Por ejemplo, se retira un clon de células B que expresa anticuerpo anti-IFN $\gamma$  humano del animal xenogénico no humano y se immortaliza según diversos métodos conocidos en la técnica. Tales células B pueden derivarse directamente de la sangre del animal o de tejidos linfoides, incluyendo pero sin limitarse al bazo, amígdalas, ganglios linfáticos y médula ósea. Las células B immortalizadas resultantes pueden expandirse y cultivarse *in vitro* para producir grandes cantidades aplicables clínicamente del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ <sub>hu</sub>. Alternativamente, los genes que codifican para las inmunoglobulinas con una o más regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse en un tipo de célula diferente, incluyendo pero sin limitarse a un sistema de cultivo de células de mamífero, con el fin

60

65

de obtener los anticuerpos directamente o cadenas individuales de los mismos, que se componen de moléculas F<sub>v</sub> de cadena sencilla.

Además, puede examinarse todo el conjunto de anticuerpos anti-IFN $\gamma$  completamente humanos generados por el animal no humano xenogénico para identificar un clon de este tipo con las características óptimas. Tales características incluyen, por ejemplo, afinidad de unión a la proteína IFN $\gamma$  humana, estabilidad de la interacción así como el isotipo del anticuerpo anti-IFN $\gamma$  completamente humano. Los clones de todo el conjunto que tienen las características deseadas se usan entonces como una fuente de secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables deseadas, para manipulación adicional para generar anticuerpos con estas características, en sistemas celulares alternativos, usando técnicas transgénicas o recombinantes convencionales.

Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas de Xenomouse™ tal como se publicaron en 1994. Véase Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994). Este enfoque se comenta y delinea adicionalmente en las solicitudes de patente estadounidense con n.ºs de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, presentada 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, el 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996 y 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las patentes estadounidenses n.ºs 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas n.ºs 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véanse también Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. Exp. Med.: 188:483-495 (1998). Véanse también la patente europea n.º, EP 0 463 151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, la solicitud de patente internacional n.º, WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la solicitud de patente internacional n.º, WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, documento WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, documento WO 00/76310, publicado el 21 de diciembre de 2000.

En un enfoque alternativo, otros han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus Ig exógeno a través de la inclusión de fragmentos (genes individuales) del locus de Ig. Por tanto, uno o más genes V<sub>H</sub>, uno o más genes D<sub>H</sub>, uno o más genes J<sub>H</sub>, una región constante mu, y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en un constructo para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la patente estadounidense n.º 5.545.807 concedida a Surani *et al.* y las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458 concedidas cada una a Lonberg y Kay, la patente estadounidense n.º 5.591.669 y 6.023.010 concedidas a Krimpenfort y Berns, las patentes estadounidenses n.ºs 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 concedidas a Berns *et al.* y la patente estadounidense n.º 5.643.763 concedida a Choi y Dunn, y las solicitudes de patente estadounidense internacional de GenPharm con n.ºs de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse también la patente europea n.º 0 546 073 B1, las solicitudes de patente internacional n.ºs WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la patente estadounidense n.º 5.981.175. Véanse además Taylor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuailon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.*, (1994), Taylor *et al.*, (1994), y Tuailon *et al.*, (1995), Fishwild *et al.*, (1996).

Una ventaja del enfoque de minilocus es la rapidez con la cual pueden generarse constructos que incluyen partes del locus de Ig e introducirse en animales. De manera acorde, sin embargo, una desventaja significativa del enfoque de minilocus es que, en teoría, se introduce una diversidad insuficiente a través de la inclusión de pequeños números de genes V, D y J. En efecto, el trabajo publicado aparece para apoyar este asunto. El desarrollo de células B y la producción de anticuerpos de animales producidos a través del uso del enfoque de minilocus parecen ser limitados. Por tanto, la investigación que rodea la presente invención se ha dirigido sistemáticamente hacia la introducción de grandes partes del locus de Ig con el fin de lograr una mayor diversidad y en un esfuerzo por reconstituir el repertorio inmunitario de los animales.

También se ha demostrado la generación de anticuerpos humanos de ratones en los que, a través de fusión microcelular, se han introducido grandes fragmentos de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las solicitudes de patente europea n.ºs 773 288 y 843 961.

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han llevado a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o de humanizados otra forma. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable inmunitaria, se espera que se observarán ciertas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos

humanos (HACA), particularmente en utilizaciones crónicas o de múltiple dosis del anticuerpo. Por tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra  $\text{IFN}\gamma$  con el fin de invalidar los problemas y/o efectos de la respuesta de HAMA o HACA.

5 La producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida también se logra a través de técnicas de humanización y presentación usando bibliotecas apropiadas. Se apreciará que pueden humanizarse o primatizarse anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Winter y Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) y Wright *et al. Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede modificarse mediante ingeniería mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, bisagra y/o el dominio de entramado por la secuencia humana correspondiente (véanse el documento WO 92102190 y las patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Además, se conoce en la técnica el uso de un ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos (Liu *et al. P.N.A.S.* 84:3439 (1987) y *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). Se aísla ARNm de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se prepara una biblioteca y se examina para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica para la región variable del anticuerpo se fusiona entonces con secuencias de regiones constantes humanas. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden encontrarse en Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación N.I.H. n.º 91-3242. Los genes de región C humanos están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación de complemento, o actividad en citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Isotipos preferidos son IgG1, IgG3 e IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humanas, kappa o lambda. El anticuerpo quimérico, humanizado se expresa entonces mediante métodos convencionales.

25 Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo, tales como Fv,  $\text{F}(\text{ab}')_2$  y Fab mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión de proteasas o química. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica para una parte del fragmento  $\text{F}(\text{ab}')_2$  incluiría secuencias de ADN que codifican para el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido por un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

30 Pueden usarse secuencias consenso de las regiones H y L para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la unión posterior de los segmentos de región V a segmentos de región C humanos. El ADNc de región C puede modificarse mediante mutagénesis dirigida al sitio para colocar un sitio de restricción a la posición análoga en la secuencia humana.

35 Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, episomas derivados de VEB, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica para una secuencia de inmunoglobulina CH o CL completamente humana funcionalmente, con sitios de restricción apropiados modificados mediante ingeniería de modo que cualquier secuencia  $\text{V}_H$  o  $\text{V}_L$ -31 pueda insertarse y expresarse fácilmente. En tales vectores, el corte y empalme se produce habitualmente entre el sitio donador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que se producen dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos en el sentido de 3' de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte, incluyendo LTR retrovirales, por ejemplo, promotor temprano de SV-40, (Okayama *et al. Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)), LTR de virus de sarcoma de Rous (Gorman *et al. P.N.A.S.* 79:6777 (1982)), y LTR de virus de leucemia murina de Moloney (Grosschedl *et al. Cell* 41:885 (1985)). También, tal como se apreciará, pueden usarse promotores nativos de Ig y similares.

40 Además, pueden generarse anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies a través de tecnologías del tipo de presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fago, presentación retroviral, presentación ribosómica, y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración de afinidad, ya que tales técnicas se conocen bien en la técnica. Wright y Harris, citado anteriormente, Hanes y Plutchau *PEAS USA* 94:4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (presentación en fago), Scott *TIB5* 17:241-245 (1992), Cwirla *et al. PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel *et al. Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al. Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell y McCafferty *TIBTECH*; 10:80-8A (1992), y la patente estadounidense n.º 5.733.743. Si las tecnologías de presentación se utilizan para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos pueden humanizarse tal como se describió anteriormente.

50 Usando estas técnicas, pueden generarse anticuerpos en células que expresan  $\text{IFN}\gamma$ , el propio  $\text{IFN}\gamma$ , formas de  $\text{IFN}\gamma$ , epítopos o péptidos del mismo, y bibliotecas de expresión para los mismos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.703.057) que pueden después de eso examinarse tal como se describió anteriormente para las actividades descritas anteriormente.

65 Diseño y generación de otros agentes terapéuticos

Según la presente descripción y basados en la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan en el presente documento con respecto a  $IFN\gamma$ , se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de restos de anticuerpos. Tales modalidades incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos de anticuerpos avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas y agentes terapéuticos radiomarcados, generación de agentes terapéuticos peptídicos, terapias génicas, particularmente intracuerpos, agentes terapéuticos antisentido, y moléculas pequeñas.

Por ejemplo, en relación con los anticuerpos biespecíficos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos uno con una especificidad para  $IFN\gamma$  y otro para una segunda molécula que se conjugan juntas, (ii) un anticuerpo sencillo que tiene una cadena específica para  $IFN\gamma$  y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para  $IFN\gamma$  y la otra molécula. Tales anticuerpos biespecíficos se generan usando técnicas que se conocen bien, por ejemplo, en relación con (i) y (ii). Véase, por ejemplo, Fanger *et al.* *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) y Wright y Harris, citado anteriormente, y en relación con (iii). Véase, por ejemplo, Trauneker *et al.* *Int. J. Cancer (Supl.)* 7:51-52 (1992).

En relación con las inmunotoxinas, pueden modificarse anticuerpos para actuar como inmunotoxinas utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993). Véase también la patente estadounidense n.º 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, tales anticuerpos modificados pueden también prepararse fácilmente utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Junghans *et al.* en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902. Resultaría probable que cada una de las inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas destruyera las células que expresan  $IFN\gamma$ , y particularmente aquellas células en las que los anticuerpos de la invención son eficaces.

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de información estructural relacionada con  $IFN\gamma$  y anticuerpos contra el mismo, tales como los anticuerpos de la invención o el examen de bibliotecas de péptidos, pueden generarse péptidos terapéuticos que están dirigidos contra  $IFN\gamma$ . El diseño y examen de agentes terapéuticos peptídicos se comenta en relación con Houghten *et al.* *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake y Litz-Daves *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). También pueden prepararse inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas, y de manera similar, en relación con restos peptídicos tal como se describió anteriormente en relación con los anticuerpos. Suponiendo que la molécula de  $IFN\gamma$  (o una forma, tal como una variante de corte y empalme o forma alternativa) es funcionalmente activa en un proceso patológico, también será posible diseñar agentes terapéuticos génicos y antisentido para el mismo a través de técnicas convencionales. Tales modalidades pueden utilizarse para modular la función del  $IFN\gamma$ . En relación con lo mismo, los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con los mismos. Un diseño y una estrategia para agentes terapéuticos antisentido se comenta en detalle en la solicitud de patente internacional n.º WO 94/29444. El diseño y las estrategias para terapia génica se conocen bien. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas terapéuticas génicas que implican intracuerpos podría demostrar ser particularmente ventajoso. Véase, por ejemplo, Chen *et al.* *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994) y Marasco *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). El diseño general de y consideraciones relacionadas con agentes terapéuticos génicos también se comentan en la solicitud de patente internacional n.º WO 97/38137.

El conocimiento obtenido de la estructura de la molécula de  $IFN\gamma$  y su interacción con otras moléculas según la presente invención, tales como los anticuerpos de la invención, y otros pueden utilizarse para diseñar racionalmente modalidades terapéuticas adicionales. A este respecto, las técnicas de diseño de fármacos racionales tales como cristalografía de rayos X, modelado molecular con la ayuda de (o asistido por) ordenador (CAMM), relación estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR), y tecnologías similares pueden utilizarse para centrar los esfuerzos de descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de estructuras sintéticas de o proteínas que pueden interaccionar con la molécula o formas específicas de la misma que pueden usarse para modificar o modular la actividad del  $IFN\gamma$ . Tales estructuras pueden sintetizarse químicamente o expresarse en sistemas biológicos. Este enfoque ha sido revisado en Capsey *et al.* *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Imprenta Stockton, Nueva York (1988)). Además, pueden diseñarse bibliotecas combinatorias y sintetizarse y usarse en programas de examen, tales como esfuerzos de examen de alto rendimiento.

#### Formulaciones y administración terapéuticas

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la invención se administrará con vehículos, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar transferencia, aplicación, tolerancia mejoradas, y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas pueden encontrarse en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's *Pharmaceutical Sciences* (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el capítulo 87 de Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que

contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, siempre que el principio activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véanse también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Phrama. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol.52:238-311 (1998) y las citas en los mismos para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu de la invención, se usan para tratar o aliviar un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

Por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un sujeto que padece la enfermedad de Crohn (EC) puede actuar directamente sobre las células inmunitarias que causan la enfermedad, proporcionando de ese modo una intervención rápida con supresión mínima del sistema inmunitario. La administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un sujeto que padece lupus eritematoso sistémico es otra indicación médica que proporciona una oportunidad para modificar las células inmunitarias responsables de la enfermedad. La administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu, una proteína completamente humana, a un sujeto que padece psoriasis evita la necesidad de tratar pacientes con medicamentos más agresivos (por ejemplo, metotrexato) que tienen efectos secundarios no deseados bien documentados (por ejemplo, daño hepático). La administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un sujeto que padece artritis reumatoide es otra indicación médica que proporciona la oportunidad de modular la generación posterior y la función de la respuesta mediada por Th1 que induce la enfermedad.

Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con una componente autoinmunitaria), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison de tipo autoinmunitario, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (PTA), enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, dermatitis hepatoforme en la enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (SFCDI), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), penfigoide cicatricial, enfermedad por crioglobulinas, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miaestenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómenos de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (ESP), también conocida como esclerosis sistémica (ES)), síndrome de Sjögren, síndrome de Stiffman, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen la enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, gromeluronefritis, enfermedad de injerto contra huésped, anemias hemolíticas, osteoartritis, septicemia, accidente cerebrovascular, trasplante de tejido y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilación.

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu modulan una respuesta inmunitaria en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto humano. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu descritos en el presente documento modulan, por ejemplo, reducen, inhiben o previenen una respuesta inmunitaria mediada por Th1 exagerada, tal como una respuesta inmunitaria mediada por Th1 exagerada asociada con un trastorno autoinmunitario o inflamatorio tal como, por ejemplo, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, sarcoidosis, artritis reumatoide, vasculitis, dermatitis atópica y esclerosis múltiple secundaria progresiva. En una respuesta inmunitaria mediada por Th1 exagerada, la(s) citocina(s) Th1, tales como IL-2, IL-3, TNF-alfa (TNF $\alpha$ ) e IFN $\gamma$ , se presentan en un sujeto a un nivel que es superior al nivel de producción de citocinas Th1 en un sujeto que no padece una enfermedad o trastorno asociado con una respuesta inmunitaria Th1 exagerada. Para clasificar una respuesta inmunitaria mediada por Th1 exagerada como una respuesta exagerada, se evalúa el nivel de una respuesta de producción de citocinas Th1, por ejemplo, midiendo y analizando el nivel de citocinas secretadas usando un ELISA u otro ensayo.

Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu descritos en este documento también se usan para modular, por ejemplo, inhibir,

reducir o prevenir, el cambio de clase a un isotipo IgG, tal como un cambio de clase inducido por IFN $\gamma$ . Estos anticuerpos anti-IFN $\gamma$  modulan, por ejemplo, inhiben, previenen o reducen una respuesta mediada por Th1 y disminuyen en consecuencia el cambio inducido por IFN $\gamma$ .

5 En una realización, las composiciones de anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu usadas para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmunitario se administran en combinación con cualquiera de una variedad de agentes anti-citocinas o agentes anti-quimiocinas. Los reactivos anti-citocinas o anti-quimiocinas adecuados reconocen, por ejemplo, citocinas como interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31, y/o quimiocinas tales como MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, IP-10, ITAC, MIG, SDF y fractalcina.

10 La presente invención proporciona también métodos de tratamiento o alivio de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmunitario. Por ejemplo, las composiciones de la invención se usan para tratar o aliviar un síntoma de cualquiera de las enfermedades autoinmunitarias y trastornos inflamatorios descritos en el presente documento. Los síntomas asociados con trastornos relacionados con el sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, pérdida de apetito, pérdida de peso, síntomas abdominales tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento, dolor o molestias articulares (artralgia), fatiga, erupciones, anemia, sensibilidad extrema al frío (fenómeno de Raynaud), debilidad muscular, fatiga muscular, cambios en el tono de la piel o tejidos, dificultad para respirar u otros patrones de respiración anómalos, dolor torácico o constricción de los músculos torácicos, frecuencia cardíaca anómala (por ejemplo, elevada o reducida), sensibilidad a la luz, visión borrosa o anómala de otro modo, y disfunción orgánica.

15 Las formulaciones terapéuticas de anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu se administran a un sujeto que padece un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. Un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio se identifica mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sujetos que padecen una enfermedad autoinmunitaria tal como la enfermedad de Crohn, lupus o psoriasis, se identifican usando cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio tales como, exploración física, examen radiológico y análisis de sangre, orina y heces para evaluar el estado inmunitario. Por ejemplo, los pacientes que padecen lupus se identifican, por ejemplo, usando la prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) para determinar si están presentes autoanticuerpos contra los núcleos celulares en la sangre. Los pacientes que padecen la enfermedad de Crohn se identifican, por ejemplo, usando un tránsito gastrointestinal superior (GI) y/o una colonoscopia para evaluar los intestinos delgado y grueso, respectivamente. Los pacientes que padecen psoriasis se identifican, por ejemplo, usando un examen microscópico de tejido que se toma de la placa de piel afectada, mientras que los pacientes que padecen artritis reumatoide se identifican usando, por ejemplo, análisis de sangre y/o radiografías u otra evaluación mediante formación de imágenes.

20 La administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un paciente que padece un trastorno relacionado con el sistema inmunitario tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio, si se logra cualquiera de una variedad de resultados de laboratorio o clínicos. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un paciente que padece un trastorno relacionado con el sistema inmunitario tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio se considera satisfactoria si uno o más de los síntomas asociados con el trastorno se alivian, reducen, inhiben o no progresan a un estado adicional, es decir, peor. La administración de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a un paciente que padece un trastorno relacionado con el sistema inmunitario tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio se considera satisfactoria si el trastorno, por ejemplo, un trastorno autoinmunitario, entra en remisión o no progresa a un estado adicional es decir, peor.

25 Formulaciones profilácticas y de diagnóstico

Los Acm anti-IFN $\gamma$  completamente humanos se usan en formulaciones profilácticas y de diagnóstico. En una realización, un Acm anti-IFN $\gamma$ hu de la invención se administra a pacientes que corren el riesgo de desarrollar una de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente. Puede determinarse una predisposición del paciente a una o más de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente usando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

30 En otra realización de la invención, se administra un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu a individuos humanos diagnosticados con una o más de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente. Tras el diagnóstico, se administra un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu para paliar o revertir los efectos de la autoinmunidad.

Los anticuerpos de la invención también son útiles en la detección de IFN $\gamma$  en muestras de pacientes y por consiguiente son útiles como agentes de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu de la invención se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA para detectar los niveles de IFN $\gamma$  en una muestra de paciente.

En una realización, se inmoviliza un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu sobre un soporte sólido (por ejemplo, el/los pocillo(s) de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado sirve como anticuerpo de captura para cualquier IFN $\gamma$  que pueda estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra de paciente, se enjuaga el soporte sólido y se trata con un agente de bloqueo tal como proteína de visón o

albúmina para prevenir la adsorción no específica del analito.

Posteriormente, se tratan los pocillos con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno, o con una disolución que contiene una cantidad patrón del antígeno. Tal muestra es, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno circulante que se consideran que son diagnóstico de una patología. Después de enjuagar la muestra de prueba o patrón, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que se marca de manera detectable. El segundo anticuerpo marcado sirve como un anticuerpo de detección. Se mide el nivel de marcador detectable, y se determina la concentración del antígeno de IFN $\gamma$  en la muestra de prueba mediante comparación con una curva patrón desarrollada a partir de las muestras patrón.

Se apreciará que basándose en los resultados obtenidos usando los anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu de la invención en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible estadificar una enfermedad (por ejemplo, un trastorno autoinmunitario o inflamatorio) en un sujeto basándose en los niveles de expresión del antígeno de IFN $\gamma$ . Para una enfermedad dada, se toman muestras de sangre de sujetos diagnosticados como que están en varios estadios en el progreso de la enfermedad, y/o en diversos puntos en el tratamiento terapéutico de la enfermedad. Usando una población de muestras que proporcione resultados estadísticamente significativos para cada estadio de progresión o terapia, se diseña un intervalo de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada estadio.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados obtenidos, se proporcionan solo para fines ilustrativos y no se interpretarán como limitativos en la presente invención.

#### EJEMPLO 1: Clonación, expresión y purificación de interferón gamma humano

##### Clonación.

Se amplificó la secuencia correspondiente a la secuencia madura de interferón gamma humano (IFN $\gamma$ h, IFN $\gamma$ hu) a partir de ADNc humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligonucleótidos específicos. Se purificó en gel la producción de amplificación y se clonó en el vector de expresión pET41c (Novagen, San Diego CA). Se modificó el vector adicionalmente para introducir Avitag<sup>TM</sup> (Avidez, Denver CO) y una cola de octa-histidina en el extremo C-terminal de IFN $\gamma$ h permitiendo la biotilación *in vivo* de la proteína y la purificación por IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, cromatografía de afinidad con ion metálico inmovilizado).

##### Expresión.

Se cotransformaron células BL21 de *E. coli* con pET41c-hIFN $\gamma$  y un vector pACYC184-BirA, que codifica para la enzima BirA requerida para la biotilación *in vivo* de la secuencia Avitag<sup>TM</sup>. Se seleccionaron las colonias individuales resistentes a kanamicina (50  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (10  $\mu$ g/ml) y se usaron para inocular un cultivo iniciador en LB (Kan 50  $\mu$ g/ml/Cm 10  $\mu$ g/ml) y se hizo crecer durante la noche a 37°C.

Al día siguiente, se utilizó el cultivo para inocular (dilución 1:100) un cultivo de 400 ml de LB (Kan 50  $\mu$ g/ml/Cm 10  $\mu$ g/ml) complementado con biotina 50  $\mu$ M. Se hizo crecer el cultivo a 37°C con agitación (240 rpm) hasta que se alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,6. En ese punto, se añadió isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM, y se incubó el cultivo adicionalmente durante 3 h en las mismas condiciones. Se centrifugaron las células a 4000 rpm durante 20 minutos, y se congeló el sedimento a -20°C. En estas condiciones esencialmente todos el IFN $\gamma$ h era insoluble y se encontró en cuerpos de inclusión.

##### Purificación.

Se descongelaron los sedimentos bacterianos y se resuspendieron en 8 ml de reactivo Bugbuster que contenía 8  $\mu$ l de Benzozase (Novagen) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se centrifugó la disolución durante 30 minutos a 15.000 g a 4°C. Se resuspendió el sedimento que contenía los cuerpos de inclusión en 7 ml de tampón de solubilización (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, guanidina-HCl 6 M). Se centrifugó el material resuspendido a 4°C durante 30 minutos a 15.000 g.

Se conectaron entre sí dos columnas quelantes Hi Trap de 5 ml (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), cargadas con NiSO<sub>4</sub> y equilibradas con tampón de solubilización, según las instrucciones del fabricante. Se filtró el sobrenadante después de la etapa de centrifugación en una membrana de 0,45  $\mu$ m y se cargó en la columna con la ayuda de una bomba peristáltica a 1 ml/min. Luego se pusieron las columnas en un sistema de cromatografía principal AKTA para el replegamiento y la elución de la proteína en la columna. Se lavó la proteína inmovilizada con 35 ml de tampón de solubilización a 1 ml/min. Se aplicó un gradiente lineal de tampón de solubilización con concentración creciente de tampón de replegamiento (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM) a 1 ml/min. durante 1

hora hasta que se alcanzó el 100% del tampón de replegamiento. Entonces se lavó la columna adicionalmente con 25 ml de tampón de replegamiento. Luego se eluyó la proteína replegada de la columna con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 400 mM). Se reunieron las fracciones que contenían proteína y se desalaron en columnas PD10 (Amersham) equilibradas con PBS. Se tomaron alícuotas de la proteína desalada y se almacenaron a -80°C.

#### EJEMPLO 2: Células que expresan interferón gamma en la superficie celular

Se transfectaron de manera estable células de ovario de hámster chino (CHO) (disponibles de la ATCC) con ADNc del IFN $\gamma$  humano marcado con c-myc. Se subclonaron los ADNc en plásmidos pCADN 3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA) que contenían genes de resistencia a la neomicina. Se seleccionaron los transfectantes usando este antibiótico, y se logró una separación celular sucesiva mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-6xHis (Sigma). Se confirmó la expresión en la superficie del IFN $\gamma$  humano a través de citometría de flujo usando un Acn anti-IFN $\gamma$  (clon B27, Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ).

#### EJEMPLO 3: Examen de bibliotecas de scFv humanas

Se describen procedimientos generales para la construcción y el manejo de bibliotecas de scFv humanas en Vaughan *et al.*, (Nat. Biotech. 1996, 14:309-314), incorporado como referencia por el presente documento en su totalidad. Se examinaron las bibliotecas de scFv humanas frente a IFN $\gamma$ h según el siguiente procedimiento.

##### *Selecciones en fase líquida.*

Se bloquearon alícuotas de bibliotecas de fagos de scFv ( $10^{12}$  ufp) obtenidas de Cambridge Antibody Technology (Cambridge, R.U.) con PBS que contenía leche desnatada al 3% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador giratorio. Luego se deseleccionaron los fagos bloqueados, sobre perlas magnéticas de estreptavidina (Dynal M-280) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador giratorio. Luego se incubaron los fagos deseleccionados, con IFN $\gamma$ h biotinilado *in vivo* (100 nM) durante dos horas a temperatura ambiente en un mezclador giratorio. Se capturaron las perlas usando un soporte magnético seguido por cuatro lavados con PBS/0,1% de Tween 20 y 3 lavados con PBS. Se añadieron directamente las perlas a 10 ml de células TG1 con crecimiento exponencial y se incubaron durante una hora a 37°C con agitación lenta (100 rpm). Se diluyó en serie una alícuota de las TG1 infectadas para titular la producción de selección. Se centrifugaron las TG1 infectadas restantes a 3000 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron en 0,5 ml de 2xTY-AG (medios 2xTY que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 2%) y se extendieron sobre placas de bioensayo de agar 2xTYAG. Después de una incubación durante la noche a 30°C, se añadieron 10 ml de 2xTYAG a las placas y se rasparon las células de la superficie y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se añadió 2xTYAG que contenía glicerol al 50% a la suspensión celular para obtener una concentración final de glicerol al 17%. Se mantuvieron alícuotas de la tanda de selección a -80°C.

##### *Selecciones en superficie celular.*

Se bloquearon alícuotas de bibliotecas de fagos de scFv ( $10^{12}$  ufp) obtenidas de Cambridge Antibody Technology (Cambridge, R.U.) con PBS que contenía leche desnatada al 3% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador giratorio. Luego se deseleccionaron los fagos bloqueados durante una hora a 37°C/5% de CO $_2$  en células CHO transfectadas con un vector pDisplay vacío (en un matraz T75 con 80% de confluencia) y que se habían bloqueado previamente con PBS que contenía leche desnatada al 2% (p/v). Luego se incubaron los fagos deseleccionados en células CHO-pDisplay-hIFN $\gamma$  durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se lavaron las células diez veces con PBS. Se eluyó el fago ligado añadiendo directamente 10 ml de TG1 con crecimiento exponencial al matraz T75 e incubando durante una hora a 37°C con agitación lenta. Se diluyó en serie una alícuota de las TG1 infectadas para titular la producción de selección. Se centrifugaron las TG1 infectadas a 3000 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron en 0,5 ml de 2xTY-AG (medios 2xTY que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 2%) y se extendieron sobre placas de bioensayo de agar 2xTYAG. Después de una incubación durante la noche a 30°C, se añadieron 10 ml de 2xTYAG a las placas y las células se rasparon de la superficie y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se añadió 2xTYAG que contenía glicerol al 50% a la suspensión celular para obtener una concentración final de glicerol al 17%. Se mantuvieron alícuotas de la tanda de selección a -80°C.

##### *Rescate del fago.*

Se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión celular obtenida de tandas de selección previas a 20 ml de 2xTYAG y se hicieron crecer a 37°C con agitación (240 rpm) hasta que se alcanzó una DO $_{600}$  de 0,3 a 0,5. Luego se sometió el cultivo a sobreinfección con  $3,3 \times 10^{10}$  de fago auxiliar MK13K07 y se incubó durante una hora a 37°C (150 rpm). Luego se cambió el medio centrifugando las células a 2000 rpm durante 10 minutos, eliminando el medio y resuspendiendo el sedimento en 20 ml de 2xTY-AK (ampicilina 100  $\mu$ g/ml; kanamicina 50  $\mu$ g/ml). Luego se hizo crecer el cultivo durante la noche a 30°C (240 rpm).

*Rescate de fago monoclonal para ELISA.*

5 Se escogieron clones individuales en una placa de microtitulación que contenía 150  $\mu$ l de medios 2xTYAG (glucosa al 2%) por pocillo y se hicieron crecer a 37°C (100-120 rpm) durante 5-6 h. Se añadió el fago auxiliar M13KO7 a cada pocillo para obtener una mutiplicidad de infección (MOI) de 10 (es decir, 10 fagos por cada célula en el cultivo) y se incubó a 37°C (100 rpm) durante 1 h. Tras el crecimiento, se centrifugaron las placas a 3.200 rpm durante 10 min. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante, se resuspendieron las células en 150  $\mu$ l de un medio 2xTYAK y se hicieron crecer durante la noche a 30°C (120 rpm). Para el ELISA, se bloquearon los fagos añadiendo 150  $\mu$ l de PBS de concentración 2x que contenía leche desnatada en polvo al 5% seguido por una incubación de una hora a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron las placas durante 10 minutos a 3000 rpm y se usaron los fagos que contenían el sobrenadante para el ELISA.

*ELISA de fago.*

15 Se recubrieron placas para ELISA (Maxisorb, NUNC) durante la noche con 2  $\mu$ g/ml de IFN $\gamma$ h en PBS. Se recubrieron placas control con BSA 2  $\mu$ g/ml. Luego se bloquearon las placas con leche desnatada al 3%/PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-0,05% de Tween 20 antes de la transferencia de los sobrenadantes de fago bloqueados previamente y la incubación durante una hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas 3 veces con PBS-0,05% de Tween 20. 50  $\mu$ l de leche desnatada al 3%/PBS que contenía el anticuerpo anti-M13 conjugado (HRP) (Amersham, diluido 1:10.000) a cada pocillo. Tras incubación a temperatura ambiente durante 1 h, se lavaron las placas 5 veces con PBS-0,05% de Tween 20. Entonces se reveló el ELISA añadiendo 50  $\mu$ l de TMB (Sigma) y 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N para detener la reacción. Se leyó la intensidad de absorción a 450nm.

25

*Secuenciación de clones de fago*

30 Se pusieron clones individuales en una placa de microtitulación que contenía 150  $\mu$ l de medios 2xTYAG (glucosa al 2%) por pocillo y se hicieron crecer a 30°C (120 rpm) durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 5  $\mu$ l de cultivo a otra placa que contenía 45  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O y se mezcló. Luego se congelaron las placas a -20°C. Después de descongelarse, se usó 1  $\mu$ l de esta suspensión para amplificación por PCR usando protocolos de PCR convencionales con un cebador específico para pCANTAB6: mycseq, 5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG- 3' (SEQ ID NO:100) y gene3leader, 5'-TTATTATTCGCAATTCCTTAGTTGTTCT-3' (SEQ ID NO: 101).

35 Se purificaron las reacciones PCR en formato de 96 pocillos usando el sistema Montage PCR $\mu$ 96 (Millipore). Se secuenciaron 5  $\mu$ l del ADN eluido usando los cebadores mycseq y gene3leader.

*Preparación periplásmica de scFv para pruebas funcionales.*

40 Se inocularon clones individuales en una placa de microtitulación de pocillos profundos que contenía 0,9 ml de medios 2xTYAG (glucosa al 0,1%) por pocillo y se hicieron crecer a 37°C durante 5-6 h (250 rpm). Luego se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de IPTG 0,2 mM en medio 2xTY para dar una concentración final de IPTG 0,02 mM. Luego se incubaron las placas durante la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Se centrifugaron las placas de pocillos profundos a 2.500 rpm durante 10 min. y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Se resuspendieron los sedimentos en 150  $\mu$ l de tampón TES (Tris/HCl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), sacarosa al 20%, complementado con inhibidor de proteasa completo, Roche). Se produjo un choque hipotónico mediante la adición de 150  $\mu$ l de tampón TES diluido (dilución 1:5 de TES:agua) e incubación en hielo durante 30 min. Luego se centrifugaron las placas a 4000 rpm durante 10 minutos para retirar células y residuos. Se transfirieron cuidadosamente los sobrenadantes a otra placa de microtitulación y se mantuvieron en hielo para las pruebas inmediatas en ensayos funcionales o ELISA.

50

*Purificación de scFv a gran escala*

55 Se inoculó un cultivo iniciador de 1 ml de 2xTYAG con una colonia individual de una placa de agar 2xTYAG recién sembrada en estrías y se incubó con agitación (240 rpm) a 37°C durante 5 horas. Se usaron 0,9 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 400 ml de los mismos medios y se hizo crecer durante la noche a 30°C con agitación vigorosa (300 rpm).

60 Al día siguiente, se indujo el cultivo añadiendo 400  $\mu$ l de IPTG 1 M y se continuó con la incubación durante 3 horas adicionales. Se recogieron las células mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendieron las células sedimentadas en 10 ml de tampón TES enfriado con hielo complementado con inhibidores de proteasa tal como se describió anteriormente. Se logró el choque osmótico mediante la adición de 15 ml de tampón TES diluido 1:5 e incubación durante 1 hora en hielo. Se centrifugaron las células a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los residuos celulares. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió imidazol al sobrenadante a una concentración final de 10 mM. Se añadió 1 ml de resina Ni-NTA (Qiagen), equilibrada en PBS, a cada tubo y se incubó en un mezclador giratorio a 4°C (20 rpm) durante 1 hora.

65

Se centrifugaron los tubos a 2.000 rpm durante 5 minutos y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Se resuspendió la resina sedimentada en 10 ml de tampón de lavado 1 frío (4°C) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH hasta 8,0). Se añadió la suspensión a una columna Polyprep (Biorad). Se usaron 8 ml de de tampón de lavado 2 frío (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH hasta 8,0) para lavar la columna por flujo de gravedad. Se eluyeron los scFv de la columna con 2 ml de tampón de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH hasta 8,0). Se analizaron las fracciones mediante la absorción a 280 nm y se reunieron las fracciones que contenían proteína antes del cambio de tampón en una columna de desalación PD10 (Amersham) equilibrada con PBS. Se analizaron los scFv en PBS mediante SDS-PAGE y se cuantificaron mediante la absorción a 280 nm. Se tomaron alícuotas de los scFv purificados y se almacenaron a -20°C y a 4°C.

**EJEMPLO 4: Inhibición del extracto scfv de la expresión del gen Indicador gamma-inducido del interferón**

Se produjeron extractos de scFv periplasmáticos de diversos anticuerpos anti-IFN<sub>γ</sub>hu tal como se describió anteriormente. Se usó un ensayo basado en células de examen de alto rendimiento para la identificación de bloqueantes de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de la actividad de IFN<sub>γ</sub>. Se transfectó un gen indicador (luciferasa de luciérnaga), dirigido por el promotor GBP1 inducible por IFN<sub>γ</sub>, en la línea celular de melanoma humano, Me67.8. Se añadieron tanto scFv como IFN<sub>γ</sub> al cultivo celular de manera concomitante. Tras un tiempo de incubación de 6 horas, se realizó el ensayo de indicador de luciferasa. Se retuvo el scFv que se encontró que inhibía la inducción de luciferasa de luciérnaga, para validación adicional.

Varios extractos de scFv inhibieron el gen indicador inducido por IFN<sub>γ</sub> de un modo dependiente de la dosis (figura 15). Por cada clon de scFv mostrado en la figura 15, se sometieron a prueba diversas concentraciones (2,7, 0,68, 0,17, 0,043 y 0,011 nM) tal como se muestra mediante las columnas sobre cada nombre de clon (concentración descendiente de izquierda a derecha). La inhibición en porcentaje mostrada por cada extracto de scFv a estas diversas concentraciones se muestra a continuación en la tabla 3.

**Tabla 3: Porcentaje de inhibición de la expresión del gen indicador inducido por IFN<sub>γ</sub> por extractos de scFv periplasmáticos**

[scFv] nM	A6	H8	A8	D8	C10	B4	B9	F9	A4	E1	C9	G7	G10	D6	G6	G9	D3	F8
2,7	82	80	85	60	63	63	62	68	36	43	56	75	47	82	73	52	69	64
0,68	92	75	86	60	50	49	53	32	1	68	67	73	44	73	66	12	55	64
0,17	100	65	87	40	53	21	56	3	0	38	58	24	0	31	25	0	36	48
0,043	87	26	65	10	34	5	0	0	0	10	33	38	0	11	0	0	28	0
0,011	0	0	13	0	19	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	20	0

**EJEMPLO 5: Inhibición de scFv de la expresión de CMH clase II inducida por interferón gamma**

Se implementó un ensayo de citometría de flujo para identificar anticuerpos IgG completamente humanos, o fragmentos de los mismos, que puedan bloquear la expresión de moléculas de CMH clase II inducida por IFN<sub>γ</sub>. Tras el cultivo en placas de células Me67.8, se añadió IFN<sub>γ</sub> humano recombinante 5 ng/ml a los cultivos en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-IFN<sub>γ</sub> completamente humanos candidatos. Tras 48 h en cultivo, se tiñeron las células con el anticuerpo anti-CMH clase II humano (HLA-DR) marcado de manera fluorescente y se analizaron usando un aparato FACSCalibur®. Por tanto, se mide la CI<sub>50</sub> (en la que se inhibe el 50% de la expresión de CMH clase II inducida por IFN<sub>γ</sub>, es decir, la concentración inhibidora del 50%), para cada anticuerpo candidato.

Se produjeron scFv completamente humanos purificados tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Se evaluó el efecto del scFv sobre la expresión de CMH clase II inducida por IFN<sub>γ</sub> en células de melanoma usando el ensayo basado en células de citometría de flujo descrito anteriormente. Estos scFv inhibieron la expresión de CMH II inducida por IFN<sub>γ</sub> en células de melanoma. (figura 16, paneles 1 a 12). Se comparó la capacidad de estos clones de scFv para inhibir la expresión de CMH II inducida por IFN<sub>γ</sub> en células de melanoma con un Acm de ratón anti-IFN<sub>γ</sub> humano denominado en el presente documento 16C3. Los clones de scFv (-) y el Acm de ratón anti-IFN<sub>γ</sub> humano 16C3 (---) se representan en la figura 16.

**EJEMPLO 6: Reconstitución de scFv en un formato de IgG**

Se produjeron scFv completamente humanos purificados tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Se amplificaron las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de scFv seleccionados con oligonucleótidos específicos introduciendo una secuencia líder y un sitio de restricción HindIII en el extremo 5'. Se introdujo un sitio Apal o AvrII en el extremo 3' de la secuencia de cadena pesada y ligera, respectivamente. Se digirieron con HindIII/Apal las secuencias de V<sub>H</sub> amplificadas y se clonaron en el vector de expresión pCon\_gamma1 (LONZA, Basilea, Suiza). Se digirieron con

HindIII/AvrII las secuencias de  $V_L$  amplificadas y se clonaron en el vector de expresión pCon\_lambda2 (LONZA). Se verificaron las construcciones mediante secuenciación antes de la transfección a células de mamífero.

Se transfectaron las secuencias de ADNc de  $V_H$  y  $V_L$  en sus vectores de expresión apropiados en células de mamífero usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche, Basilea, Suiza). Brevemente, se cultivaron células Peak en placas de 6 pocillos a una concentración de  $6 \times 10^5$  células por pocillo en 2 ml de medios de cultivo que contenían suero bovino fetal. Se cotransfectaron los vectores de expresión, que codificaban para las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  candidatas, en las células usando el reactivo de transfección Fugene 6 según las instrucciones del fabricante. Al día siguiente de la transfección, se aspiraron los medios de cultivo, y se añadieron 3 ml de medios nuevos libres de suero a las células y se cultivaron durante tres días a 37°C. Tras un periodo de cultivo de tres días, se recogió el sobrenadante para purificarse la IgG en columnas de proteína G.

Se purificó IgG completamente reconstituida de sobrenadantes libres de suero de células transfectadas usando columnas de flujo rápido de proteína G-Sepharose 4B (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron los sobrenadantes de las células transfectadas durante la noche a 4°C con tampón de unión de IgG ImmunoPure (G) (Pierce, Rockford IL). Luego se hicieron pasar muestras por columnas de flujo rápido de proteína G-Sepharose 4B y la IgG se purificó en consecuencia usando tampón de elución. Luego se dializó la fracción de IgG eluida frente a PBS y se cuantificó el contenido de IgG mediante la absorción a 280 nm. La pureza y la integridad de IgG se verificaron mediante SDS-PAGE.

EJEMPLO 7: Inhibición de la expresión de CMH clase II inducida por interferón gamma mediante scFv reconstituido

Se reconstituyeron scFv en un formato de IgG tal como se describió anteriormente. Se evaluó el efecto de los clones de IgG sobre la expresión de CMH clase II inducida por  $IFN\gamma$  en células de melanoma usando el ensayo basado en células de citometría de flujo descrito anteriormente en el ejemplo 2. Tal como se muestra en la figura 17, paneles 1 a 7, estos clones de IgG inhibieron la expresión de CMH II inducida por  $IFN\gamma$  en células de melanoma. Se comparó la capacidad de estos clones de IgG para inhibir la expresión de CMH II inducida por  $IFN\gamma$  en células de melanoma con el Acm de ratón anti- $IFN\gamma$  humano 16C3 y el anticuerpo de ratón anti- $IFN\gamma$  humano de R&D Systems MAB285. Se representan los clones completamente de IgG (-x-), el Acm de ratón anti- $IFN\gamma$  humano 16C3 (-▲-), y el anticuerpo de ratón anti- $IFN\gamma$  humano de R&D Systems (Minneapolis, MN) MAB285 (-●-).

Los valores de  $CI_{50}$  para estos clones de IgG se muestran a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4. Análisis de  $CI_{50}$  de anticuerpos monoclonales anti- $IFN\gamma$  completamente humanos.**

Acm IgG	$CI_{50}$ del ensayo basado en células de inhibición de CMH II
16C3	100 pM
MAB285	400 pM
AC1.2R3P2_A6	41 pM
AD14R4P1_B9	322 pM
AC1.4R4P2_C10	203 pM
AC1.2R3P2_D8	708 pM
AD1.3R3P5_F8	1525 pM
AD1.3R3P6_F9	185 pM
AD14R4P2_G7	233 pM

EJEMPLO 8: Retromutación del clon del anticuerpo  $IFN\gamma$ hu con respecto a la secuencia de línea germinal

En los estudios descritos en el presente documento, se mutaron los nucleótidos y residuos de aminoácidos en la secuencia de ácido nucleico y aminoácidos del clon A6 para corresponder al nucleótido o residuo de aminoácido que se encuentra en la secuencia de la línea germinal. Este proceso se denomina en el presente documento "retromutación".

**Cadena pesada de A6:** El gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo A6 tenía una homología del 100% con la línea germinal humana DP-47 o IGHV3-23 (número de registro Genbank M99660). Se comparó la región de unión pesada de inmunoglobulina (IGHJ) de A6 con las seis regiones IGHJ funcionales humanas. La región IGHJ de A6 se identificó como IGHJ2 (tabla 5A a continuación), pero tenía una mejor homología total con IGHJ5-02 (tabla 5B a continuación). Por tanto, se mutó la región IGHJ original de A6 para corresponder a la secuencia de IGHJ5-02, pero solo para la secuencia fuera de la CDR3. Los nucleótidos y residuos de aminoácidos mutados se muestran en recuadros en las tablas 5A y 5B, y están subrayadas las regiones CDR.

Tabla 5A: Comparación entre A6 y genes IGHJ2 funcionales humanos

```

ACCACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT A6 (SEQ ID NO:109)
  E  H  W  F  D  P  W  G  R  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:110)
CTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA IGHJ2 (SEQ ID NO:111)
  Y  W  Y  F  D  L  W  G  R  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:112)
  CDR 3
    
```

5 Tabla 5B: Comparación entre A6 y el gen IGHJ5-02 funcional humano

```

CACACTGGTTCGACCCCTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACCCGTCTCGAGT A6 (SEQ ID NO:113)
  E  W  F  D  P  W  G  R  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:114)
ACAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA IGHJ5-02 (SEQ ID NO:115)
  N  W  F  D  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:116)
  CDR 3
    
```

10 *Cadena ligera de A6:* El gen variable de cadena lambda de inmunoglobulina (VL) del anticuerpo A6 pertenece al subgrupo IGLV6-57 o V1-22 (número de registro Genbank Z73673). A6-VL tiene 7 mutaciones en comparación con IGLV6-57, tres en las CDR y cuatro en las regiones de entramado (tabla 6 a continuación). Los nucleótidos mutados y residuos de aminoácidos se muestran en recuadros en la tabla 6, y están subrayadas las regiones CDR.

15 Las cuatro mutaciones en las regiones de entramado son: Ser a Ala en la región de entramado 2 en la posición de Kabat 43; Ser a Thr en la región de entramado 3 en la posición de Kabat 72; Lys a Glu y Thr a Ala en la región de entramado 3 en las posiciones de Kabat 79 y 80, respectivamente. Las cuatro mutaciones en las regiones de entramado se cambiaron primero individualmente, luego todas juntas de vuelta al residuo correspondiente de la línea germinal humana. Las mutaciones de estos cuatro residuos de vuelta al aminoácido correspondiente de la línea germinal humana, no alteró en modo alguno la afinidad de unión del anticuerpo NI-0501, también denominado en el

20 presente documento "A6 retromutado", con respecto a su antígeno diana en comparación con el anticuerpo A6. Se llevaron a cabo las mutaciones de la secuencia VL de A6 con respecto al residuo correspondiente de la línea germinal en CDR1 (Ala a Val) y CDR2 (Gln a Arg) y demostraron que no modificaban la afinidad global por IFN $\gamma$ hu del anticuerpo NI-0501 (A6retromutado) en comparación con el anticuerpo A6.

25 Tabla 6: Comparación entre A6 y el gen IGHV6-57 funcional humano

```

                                CDR 1          43          CDR 2
IGLV6-57 humano NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSPTTVIYEDMQRPSGVP 60
A6-VL           NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSPTTVIYEDMQRPSGVP 60
*****;*****;*****;*****

                                72          79,80          CDR 3
IGLV6-57 humano DRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSN----- 98 (SEQ ID NO:117)
A6-VL           DRFSGSIDSSNSASLTISGLEAEDADYYCQSYDSSNRWMPGGGTKLTVLG 112 (SEQ ID
NO:118)
*****;*****;*****;*****
    
```

30 Las secuencias completas de las cadenas pesadas y ligeras de NI-0501 se exponen en las figuras 1A a 1D. Los nucleótidos y residuos de aminoácidos que se retromutaron para producir el anticuerpo NI-0501 (es decir, aquellos nucleótidos y residuos que se cambiaron de la secuencia de A6 original) están subrayados y en cursiva en las figuras 1A y 1C.

35 EJEMPLO 9: Afinidad y cinética de unión del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu

Se caracterizaron la afinidad y cinética de unión del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu NI-0501 en un instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron 200 UR de NI-0501 por química de EDC/NHS en un chip Biacore C1. Se midió la unión haciendo pasar IFN $\gamma$ h (R&D Systems) en tampón HBS-EP a concentraciones de entre 200 nM y 1 nM. La velocidad de flujo era de 100  $\mu$ l/minuto y la temperatura se fijó a 25°C. Los datos se ajustaron según el

40 modelo de Langmuir 1:1 y se determinaron los valores de K<sub>on</sub>, K<sub>off</sub> y K<sub>D</sub> (figura 18).

EJEMPLO 10: Actividad del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu

45 Se comparó la actividad del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu NI-0501 con la actividad del anticuerpo producido por el clon A6 (es decir, el anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu A6). En este estudio, se evaluó la capacidad de cada anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu para inhibir la regulación por incremento de CMH clase II inducida por IFN $\gamma$  humano recombinante (IFN $\gamma$ hur) en la línea celular de melanoma humano, Me67.8. Brevemente, se incubaron células de melanoma Me67.8 con IFN $\gamma$ hur, en

presencia de NI-0501 o el anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu A6 durante 48-72 h. Se midió la regulación por incremento de CMH clase II tal como se describió anteriormente en el ejemplo 5. Los dos anticuerpos presentaron una actividad similar, lo que demuestra que las retromutaciones en el anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu NI-0501 no modificaron la actividad del anticuerpo (figura 19).

5

Luego se sometió a prueba la actividad del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu NI-0501 con IFN $\gamma$  nativo. En este estudio, se activaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas con 1  $\mu$ g/ml del mitógeno PHA durante 48 h, y se sometieron a prueba los sobrenadantes a través de ELISA para determinar la presencia de IFN $\gamma$  nativo. Este sobrenadante se utilizó luego para estimular la regulación por incremento de CMH clase II en células Me67.8. NI-0501 pudo neutralizar la regulación por incremento de CMH clase II inducida por IFN $\gamma$  humano nativo (figura 20).

10

EJEMPLO 11: Reactividad cruzada del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu

*Ensayo de unión:* Se sometió a prueba NI-0501 para determinar su capacidad para unirse a IFN $\gamma$  usando un ensayo de formato ELISA tipo sándwich. Brevemente, se capturó el IFN $\gamma$  de la especie mencionada en el título de cada gráfico mostrados en la figura 21 con NI-0501 recubierto previamente (-▲-)o Acm anti-IFN $\gamma$  de especie de control (-■-). Se detectó el IFN $\gamma$  de cada especie usando un anticuerpo policlonal específico para el IFN $\gamma$  en ese ensayo. Tal como se observa en la figura 21, NI-0501 que une a IFN $\gamma$  de rata es similar al anticuerpo de control, pero no para las otras especies, excluyendo el macaco.

15

20

*Neutralización de la actividad de IFN $\gamma$ :* Se sometió a prueba el anticuerpo NI-0501 para determinar su capacidad para neutralizar o inhibir proteínas de IFN $\gamma$  recombinantes de varias especies diferentes. Brevemente, se puso en cultivo IFN $\gamma$  recombinante de las diversas especies sometidas a prueba, con células Me67.8 en presencia o ausencia de NI-0501 durante 48-72 h. Se midió la regulación por incremento de CMH clase II tal como se describió anteriormente en el ejemplo 5. Se demostró la reactividad cruzada con, y la neutralización de, IFN $\gamma$  de macaco mediante la inhibición de la regulación por incremento de CMH clase II en la línea celular de melanoma humano, Me67.8 (figura 21). NI-0501 pudo inhibir IFN $\gamma$  de macaco pero no pudo neutralizar IFN $\gamma$  de las otras especies sometidas a prueba, demostrando que no hay reactividad cruzada del anticuerpo con estas especies (tabla 7).

25

30

Tabla 7: Reactividad Cruzada del NI-0501

NI-0501	IFN $\gamma$ hun	IFN $\gamma$ hur	IFN $\gamma$ mn	IFN $\gamma$ mr	IFN $\gamma$ pr	IFN $\gamma$ gr	IFN $\gamma$ rr	IFN $\gamma$ rar
Unión	+	+	+	+	-	-	-	-
Neutralización	+	+	+	+	*	*	*	*
hun = IFN $\gamma$ humano nativo								
hur = IFN $\gamma$ humano recombinante								
mn = IFN $\gamma$ de macaco nativo								
mr = IFN $\gamma$ de macaco recombinante								
pr = IFN $\gamma$ de perro recombinante								
gr = IFN $\gamma$ de gato recombinante								
rr = IFN $\gamma$ de rata recombinante								
rar = IFN $\gamma$ de ratón recombinante								
+ = reactividad cruzada								
- = no hay reactividad cruzada								
* = no sometido a prueba								

Además, se activaron PBMC de macaco con 1  $\mu$ g/ml del mitógeno PHA durante 48 h, y se sometieron a prueba los sobrenadantes a través de ELISA para determinar la presencia de IFN $\gamma$  nativo. Este sobrenadante se utilizó luego para estimular la regulación por incremento de CMH clase II con Me67.8. NI-0501 pudo neutralizar la regulación por incremento de CMH clase II inducida por IFN $\gamma$  de macaco (figura 22).

35

EJEMPLO 12: Actividad biológica del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu

Los estudios descritos en el presente documento se diseñaron para someter a prueba la actividad biológica del anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu NI-0501 con su administración a macacos. Se eligió NI-0501 para los estudios de seguridad y farmacocinética (PK) descritos en el presente documento porque se encontró que este anticuerpo anti-IFN $\gamma$ hu puede dar reactividad cruzada con el IFN $\gamma$  de macacos, tal como se describió anteriormente. Para evaluar los efectos clínicos adversos después de múltiples infusiones intravenosas, se les infundió a los monos las dosis siguientes: 30 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg.

40

45

5 En ratones con un gen de IFN $\gamma$  perturbado, se observaron niveles disminuidos de IgG2a y niveles aumentados de IgG1 en respuesta a la inmunización con KLH, demostrando la correlación entre IFN $\gamma$  y la respuesta de IgG. Durante el estudio toxicológico principal de 13 semanas, se inmunizaron los monos con KLH en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Una respuesta inmunitaria típica frente a KLH/IFA en monos, tratados conjuntamente con placebo, provoca una respuesta de IgM e IgG específica para KLH detectable en el suero. Estos estudios se diseñaron para evaluar si la neutralización de IFN $\gamma$  en monos tratados con NI-0501 que se inmuniza con KLH en IFA, altera el título de IgG específico de KLH.

10 EJEMPLO 13: Modulación de la actividad de IFN $\gamma$  usando anticuerpos anti-IFN $\gamma$ hu

15 La producción de la quimiocina IP-10 está regulada por incremento por IFN $\gamma$  en varias líneas celulares diferentes. Basándose en esta observación, se desarrolló un ensayo en sangre completa. En este ensayo en sangre completa, se mezclaron muestras de sangre completa de varios donantes con una concentración fija de IFN $\gamma$  y diferentes concentraciones de NI-0501. Después de la incubación, se midieron los niveles de IP-10 mediante ELISA como medio para evaluar la eficacia del anticuerpo anti-IFN $\gamma$  para bloquear la producción de IP-10 (figura 23).

Otras realizaciones

20 Aunque se ha descrito la invención junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo anti-IFN $\gamma$  monoclonal completamente humano aislado o fragmento del mismo, comprendiendo dicho anticuerpo:
  - (a) una región CDR1 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos SYAMS (SEQ ID NO:3);
  - (b) una región CDR2 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:4), y
  - (c) una región CDR3 de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos DGSSGWYVPHWFDP (SEQ ID NO:5);
  - (d) una región CDR1 de V<sub>L</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO:8);
  - (e) una región CDR2 de V<sub>L</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos EDNQRPS (SEQ ID NO:9); y
  - (f) una región CDR3 de V<sub>L</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos QSYDGSNRWM (SEQ ID NO:10);
 y uniéndose dicho anticuerpo al IFN $\gamma$  humano.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, siendo dicho anticuerpo un isotipo de IgG.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
4. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo.
5. Uso de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$  en la fabricación de un medicamento para aliviar un síntoma de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio en un sujeto que necesita el mismo, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y en el que dicho anticuerpo está presente en dicho medicamento en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma de la enfermedad autoinmunitaria o del trastorno inflamatorio en el sujeto.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho sujeto es un ser humano.
7. Uso según la reivindicación 5, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria o dicho trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, artritis reumatoide, vasculitis, dermatitis atópica y esclerosis múltiple secundaria progresiva.
8. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho medicamento se formula para administración intravenosa.
9. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo se administra conjuntamente con un segundo agente seleccionado del grupo que consiste en:
  - (a) una anticitocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31;
  - (b) un reactivo antiquimiocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31; y
  - (c) una quimiocina seleccionada de MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, IP-10, ITAC, MIG, SDF y fractalcina.
10. Uso de un anticuerpo anti-IFN $\gamma$  en la fabricación de un medicamento para reducir la expresión del CMH clase II en una célula, en el que dicho anticuerpo anti-IFN $\gamma$  es un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho medicamento se formula para entrar en contacto con una célula, y en el que dicho anticuerpo anti-IFN $\gamma$  está presente en dicho medicamento en una cantidad suficiente para reducir la expresión del CMH clase II en dicha célula.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha célula es una célula de melanoma humano.

12. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha célula se pone en contacto con un segundo agente seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 (a) una anticitocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31;
- (b) un reactivo antiquimiocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31; y
- 10 (c) una quimiocina seleccionada de MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, IP-10, ITAC, MIG, SDF y fractalcina.
13. Anticuerpo anti-IFN $\gamma$  para su uso en un método para aliviar un síntoma de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio en un sujeto que necesita el mismo, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 14. Anticuerpo según la reivindicación 13 para su uso en el método según la reivindicación 13, en el que dicho sujeto es un ser humano.
- 20 15. Anticuerpo según la reivindicación 13 para su uso en el método según la reivindicación 13, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria o dicho trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, artritis reumatoide, vasculitis, dermatitis atópica y esclerosis múltiple secundaria progresiva.
- 25 16. Anticuerpo según la reivindicación 13 para su uso en el método según la reivindicación 13, administrándose dicho anticuerpo por vía intravenosa.
17. Anticuerpo según la reivindicación 13 para su uso en el método según la reivindicación 13, administrándose conjuntamente dicho anticuerpo con un segundo agente seleccionado del grupo que consiste en:
- 30 (a) una anticitocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31;
- 35 (b) un reactivo antiquimiocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31; y
- (c) una quimiocina seleccionada de MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, IP-10, ITAC, MIG, SDF y fractalcina.
- 40 18. Anticuerpo anti-IFN $\gamma$  para su uso en un método para reducir la expresión del CMH clase II en una célula, siendo dicho anticuerpo anti-IFN $\gamma$  un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, formulándose dicho anticuerpo anti-IFN $\gamma$  para entrar en contacto con una célula en una cantidad suficiente para reducir la expresión del CMH clase II en dicha célula.
- 45 19. Anticuerpo anti-IFN $\gamma$  según la reivindicación 18 para su uso en el método según la reivindicación 18, en el que dicha célula es una célula de melanoma humano.
20. Anticuerpo anti-IFN $\gamma$  según la reivindicación 18 para su uso en el método según la reivindicación 18, en el que dicha célula se pone en contacto con un segundo agente seleccionado del grupo que consiste en:
- 50 (a) una anticitocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31;
- 55 (b) un reactivo antiquimiocina que reconoce una o más citocinas seleccionadas de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31; y
- (c) una quimiocina seleccionada de MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, IP-10, ITAC, MIG, SDF y fractalcina.

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
  e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTIAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
  s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
  p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
  a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATGGT
  l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g
301 AGCAGTGGCT GGTACGTACC AACTGGTTC GACCCCTGGG GCCAGGGCAC CCTGGTCACC
  s s g w y v p h w f d p w g g g t l v t
361 GTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)
      v s s (SEQ ID NO:2)
  
```

Fig. 1A

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                                     (SEQ ID NO:3)          (SEQ ID NO:4)
1 EVQLLESGGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDG SSGWYVPHWF DPWGQGTLTVT
121 VSS (SEQ ID NO:2)                                     (SEQ ID NO:5)
  
```

Fig. 1B

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1 AATTTTATGC TGACTAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC
  n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61 TCCTGCACTC GCAGCAGTGG CAGCATTGCC AGCAACTATG TGCAGTGGTA CCAACAGCGC
  s c t r s s g s i a s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTT CCCCCACCAC TGTCATCTAT GAGGATAACC AGAGACCCTC TGGGGTCCCT
  p g s s p t t v i y e d n g r p s g v p
181 GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCAATTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGG
  d r f s g s i d s s s n s a s l t i s g
241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGATGGCAG CAATCGTTGG
  l k t e d e a d y y c q s y d g s n r w
301 ATGTTCGGCG GAGGGACCAA GCTGACCGTC CTA (SEQ ID NO:6)
      m f g g g t k l t v l (SEQ ID NO:7)
  
```

Fig. 1C

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                                     (SEQ ID NO:8)          (SEQ ID NO:9)
1 NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIA SNYVQWYQQR PGSSPTTVIY EDNQRPSGVP
61 DRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTEDEADYY QSYDGSNRW MFGGGTKLTV L (SEQ ID NO:8)
                                     (SEQ ID NO:10)
  
```

Fig. 1D

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATGGT
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g
301 AGCAGTGGCT GGTACGTACC AACTGGTTC GACCCCTGGG GCCGGGGCAC CCTGGTCACC
   s s g w y v p h w f d p w g r g t l v t
361 GTCTCGAGT (SEQ ID NO:102)
   v s s (SEQ ID NO:103)

```

**Fig. 1E**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)           (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61  ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDG SSGWYVPHWF DPWGRGTLVT
121 VSS (SEQ ID NO:103)                               (SEQ ID NO:5)

```

**Fig. 1F**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACTC GCAGCAGTGG CAGCATTGTC AGCAACTATG TGCACTGGTA CCAACAGCGC
   s c t r s s g s i v s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTG CCCCCACCAC TGTCATCTAT GAGGATAACC GGAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s a p t t v i y e d n r r p s g v p
181 GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCAATACTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGG
   d r f s g s i d s s s n t a s l t i s g
241 CTGGAGGCTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGATGGCAG CAATCGTTGG
   l e a e d e a d y y c q s y d g s n r w
301 ATGTTTCGGC GAGGGACCAA GCTGACCGTC CTAGGT (SEQ ID NO:104)
   m f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:105)

```

**Fig. 1G**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:106)           (SEQ ID NO:107)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIV SNYVQWYQOR PGSAPTTVIY EDNRRPSGVP
61  DRFSGSIDSS SNTASLTISG LEAEDEADYY CQSYDGSNRW MFGGGTKLTV LG (SEQ ID NO:105)
                               (SEQ ID NO:10)

```

**Fig. 1H**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATCAT
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d h
301 AGCAGTGGCT GGTACGTAAT CTCCGGTATG GACGTCTGGG GCCGAGGGAC AATGGTCACC
   s s g w y v i s g m d v w g r g t m v t
361 GTCTCGAGT (SEQ ID NO:11)
   v s s (SEQ ID NO:12)

```

Fig. 2A

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)          (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61  ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDH SSGWYVISGM DVWGRGTMVT
121 VSS (SEQ ID NO:12)                               (SEQ ID NO:13)

```

Fig. 2B

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CAGCATTGCC AGCAACTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s s g s i a s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTT CCCCCACCAC TGTGATCTCT GAGGATAACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s s p t t v i s e d n q r p s g v p
181 GATCGGTTCT CTGGCTCCGT CGACAGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATTCTGGA
   d r f s g s v d s s s n s a s l t i s g
241 CTGAGGACTG AGGACGAGGC TGACTATTAC TGTCAGTCTA ATGATTCCGA CAATGTGGTT
   l r t e d e a d y y c q s n d s d n v v
301 TTCGGCGGAG GGACCAAGCT GACCGTCCTA GGT (SEQ ID NO:14)
   f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:15)

```

Fig. 2C

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:16)          (SEQ ID NO:17)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIA SNYVQWYQQR PGSSPTTVIS EDNQRPSGVP
61  DRFSGSDVSS SNSASLTISG LRTEDEADYY QSNDSDNVV FGGGTKLTVL G (SEQ ID NO:15)
                               (SEQ ID NO:18)

```

Fig. 2D

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATCCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n p k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAGGACCTA
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d l
301 ACAGTGGGTG GTCCTGGTA CTACTTTGAC TACTGGGGCC AAGGAACCCT GGTCACCGTC
   t v g g p w y y f d y w g q g t l v t v
361 TCAGT (SEQ ID NO:19)
   s s (SEQ ID NO:20)

```

**Fig. 3A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)           (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNPKNLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDL TVGGPWYFD YWGQTLVTV
121 SS (SEQ ID NO:20)                               (SEQ ID NO:21)

```

**Fig. 3B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CAGCATTGTG AGCAACTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s s g s i v s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTG CCCCCACCAC TGTGATCTTT GACGATGACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s a p t t v i f d d d q r p s g v p
181 GGTCGTTCT CTGGCTCCCT CGACAGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGG
   g r f s g s l d s s s n s a s l t i s g
241 CTGCAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGATAGCAG CAATGTGGTA
   l q t e d e a d y y c q s y d s s n v v
301 TTCGGCGGGG GGACCAAGGT CACCGTCTTA GGT (SEQ ID NO:22)
   f g g g t k v t v l g (SEQ ID NO:23)

```

**Fig. 3C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:8)           (SEQ ID NO:25)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIV SNYVQWYQOR PGSAPTTVIF DDDQRPSGVP
61 GRFSGSLDSS SNSASLTISG LQTEDEADYY COSYDSSNVV FGGGTKVTVL G (SEQ ID NO:23)
                               (SEQ ID NO:26)

```

**Fig. 3D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAAGATGGA
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g
301 TGGAACGCGC TGGGATGGCT TGAATCCTGG GGCCGGGGCA CCCTGGTCAC
   w n a l g w l e s w g r g t l v
351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:27)
   t v s s (SEQ ID NO:28)

```

**Fig. 4A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)      (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAKDG WNALGWLESW GRGTLVTVSS (SEQ
ID NO:28)                               (SEQ ID NO:29)

```

**Fig. 4B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAGGAC GATAACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g r t i t i
61 TCCTGCACCC GCAGTGGTGG CAGCATTGGC AGCTACTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s g g s i g s y y v q w y q q r
121 CCGGGCACTG CCCCCACCAC TGTGATCTAT GACGATAAAA AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g t a p t t v i y d d k k r p s g v p
181 GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   d r f s g s i d s s s n s a s l t i s g
241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAT TGTCAGTCTT ATGATAGCAA CAATCTTGTG
   l k t e d e a d y y c q s y d s n n l v
301 GTTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTCACCGTC CTAGGT (SEQ ID NO:30)
   v f g g g t k v t v l g (SEQ ID NO:31)

```

**Fig. 4C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:32)      (SEQ ID NO:33)
1  NFMLTQPHSV SESPGRITTI SCTRSGGSIG SYVQWYQOR PGTAPTTVIY DDKKRPSGVP
61 DRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTEDEADYY CQSYDSNNLV VFGGGTKVTV LG (SEQ ID NO:31)
                               (SEQ ID NO:34)

```

**Fig. 4D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

1 GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC  
 e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l  
 61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT  
 s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a  
 121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC  
 p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y  
 181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT  
 a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y  
 241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATGGT  
 l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g  
 301 AGCAGTGGCT GTACGTACC ACACTGGTTC GACCCCTGGG GCAGGGGGAC AATGGTCACC  
 s s g w y v p h w f d p w g r g t m v t  
 361 GTCTCGAGT (SEQ ID NO:35)  
 v s s (SEQ ID NO:36)

**Fig. 5A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

(SEQ ID NO:3) (SEQ ID NO:4)  
 1 EVQLLES<sup>GGG</sup> LVQP<sup>GGSLRL</sup> SCAAS<sup>GFTFS</sup> SYAMSWVRQA PGK<sup>GLEWVSA</sup> ISGSGGSTYY  
 61 ADSVKGRFTI SRD<sup>NSKNTLY</sup> LQM<sup>NSLRAED</sup> TAVYYCAKDG SSG<sup>WYVPHWF</sup> DPWGRGTMVT  
 121 VSS (SEQ ID NO:36) (SEQ ID NO:5)

**Fig. 5B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

1 AATTTTATGC TGA<sup>CTCAGCC</sup> CCA<sup>CTCTGTG</sup> TCG<sup>GAGTCTC</sup> CGG<sup>GGAAGAC</sup> GGTA<sup>ACCATC</sup>  
 n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i  
 61 TCCTGCACCC GCAG<sup>CAGTGG</sup> CACC<sup>ATTGCC</sup> AGCA<sup>ACTATG</sup> TGCAG<sup>TGGTA</sup> CCAG<sup>CAGCGC</sup>  
 s c t r s s g t i a s n y v q w y q q r  
 121 CCGGGCAGTT CCCC<sup>ACCAC</sup> TGT<sup>GATCTAT</sup> GAGG<sup>ATAACC</sup> AAAG<sup>ACCCTC</sup> TGGGG<sup>TCCCT</sup>  
 p g s s p t t v i y e d n q r p s g v p  
 181 GATCGGTTCT CTGG<sup>CTCCAT</sup> CGAC<sup>AGCTCC</sup> TCCA<sup>ACTCTG</sup> CCT<sup>CCCTCAC</sup> CAT<sup>CTCTGGA</sup>  
 d r f s g s i d s s s n s a s l t i s g  
 241 CTGAAGACTG AGG<sup>ACGAGGC</sup> TGACT<sup>ACTAC</sup> TGTC<sup>AGTCTT</sup> ATGATA<sup>ACAG</sup> CAAT<sup>CATTGG</sup>  
 l k t e d e a d y y c q s y d n s n h w  
 301 GTGTT<sup>CGGCG</sup> GAGGG<sup>ACCAA</sup> GGTC<sup>ACCGTC</sup> CTAG<sup>GT</sup> (SEQ ID NO:37)  
 v f g g g t k v t v l g (SEQ ID NO:38)

**Fig. 5C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

(SEQ ID NO:39) (SEQ ID NO:17)  
 1 NFMLTQPHSV SESP<sup>GKTVTI</sup> SCTR<sup>SSGTIA</sup> SNYV<sup>QWYQOR</sup> PGSS<sup>PTTVIY</sup> EDN<sup>ORPSGVP</sup>  
 61 DRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTE<sup>DEADYY</sup> CQSY<sup>DNSNHV</sup> VFGG<sup>GTKVTV</sup> LG (SEQ ID NO:38)  
 (SEQ ID NO:40)

**Fig. 5D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CAGGGGGGTC CCTGAAACTC  
 e v q l l e s g g g l v q p g g s l k l  
 61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCAATGCCA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT  
 s c a a s g f t f s s n a m s w v r q a  
 121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAACT CTTACTGGTA GTGGTGGTAC CGCATACTAC  
 p g k g l e w v s t l t g s g g t a y y  
 181 GCAGACTCCG TGGAGGGCCG GTTCAGCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACTACTGTAT  
 a d s v e g r f s i s r d n s k n t l y  
 241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAGGGCAGC  
 l q m n s l r a e d t a v y y c a k g t  
 301 GAACTCGTGG GAGGAGGACT TGACAACTGG GGCCAAGGCA CCCTGGTCAC  
 e l v g g g l d n w g q g t l v  
 351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:41)  
 t v s s (SEQ ID NO:42)

**Fig. 6A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

(SEQ ID NO:43) (SEQ ID NO:44)  
 1 EVQLLES<sup>GGG</sup>LVQPGGSLKL SCAASGFTFS SNAMSWVRQA PGKLEWVST LTGSGGTAYY  
 61 ADSVEGRFSI SRDNSKNTLY LQMN<sup>SLRAED</sup> TAVYYCAKGT ELVGGGLDNW GQGLTVTVSS (SEQ  
 ID NO:42) (SEQ ID NO:45)

**Fig. 6B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

1 AATTTTATGC TGA<sup>CTCAGCC</sup> CCACTCTCTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTGACGATC  
 n f m l t q p h s l s e s p g k t v t i  
 61 TCCTGCACCG GCAGCGGAGG CAGCATTGCC ACCAACTATG TGCAGTGGTA TCAGCAGCGC  
 s c t g s g g s i a t n y v q w y q q r  
 121 CCGGGCAGTG CCCCCACCAC TGTGATCCAT GAGGATAACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT  
 p g s a p t t v i h e d n q r p s g v p  
 181 GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACGGCTCC TCCA<sup>ACTCTG</sup> CCTCCCTCAC CATCTCTGGA  
 d r f s g s i d g s s n s a s l t i s g  
 241 CTGCAGCCTG AGGACGAGGC TGATTACTAC TGTCAGTCTT ATGATAGTGA CAATCATCAT  
 l q p e d e a d y y c q s y d s d n h h  
 301 GTGGTATT<sup>CG</sup> GCGGAGGGAC CAAGCTGACC GTCCTAGGT (SEQ ID NO:46)  
 v v f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:47)

**Fig. 6C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

(SEQ ID NO:48) (SEQ ID NO:17)  
 1 NFMLTQPHSL SESP<sup>GKTVTI</sup> SCTGSGGSIA TNYVQWYQQR PGSAPTTVIH EDNQRPSGVP  
 61 DRFSGSIDGS SNSASLTISG LQPEDEADYY CQSYDSDNHH VVFGG<sup>TKLT</sup> VLG (SEQ ID NO:47)  
 (SEQ ID NO:49)

**Fig. 6D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC  
 e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l  
 61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT  
 s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a  
 121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC  
 p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y  
 181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT  
 a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y  
 241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAAGATGGA  
 l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g  
 301 TGGAACGCGC TGGGATGGCT TGAATCCTGG GGCAAGGGGA CAATGGTCAC  
 w n a l g w l e s w g k g t m v  
 351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:50)  
 t v s s (SEQ ID NO:51)

**Fig. 7A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

(SEQ ID NO:3) (SEQ ID NO:4)  
 1 EVQLLES<sup>GGG</sup> LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY  
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMN<sup>SLRAED</sup> TAVYYCAKDG WNALGWLESW GKGTMTVSS (SEQ  
 ID NO:51) (SEQ ID NO:29)

**Fig. 7B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

1 AATTTTATGC TGA<sup>CT</sup>CAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC  
 n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i  
 61 TCCTGCACCG GCAGCAGTGG CAGCATTGCC AGCAACTATG TGCACTGGTA CCAGCAGCGC  
 s c t g s s g s i a s n y v q w y q q r  
 121 CCGGGCAGTG CCCCCACCAC TGTGATCTAT GAGGATAACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT  
 p g s a p t t v i y e d n q r p s g v p  
 181 GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCA<sup>ACT</sup>CTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA  
 d r f s g s i d s s s n s a s l t i s g  
 241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGATAGCAG CAATCAAGAG  
 l k t e d e a d y y c q s y d s s n q e  
 301 GTGGTATT<sup>CG</sup> GCGGAGGGAC CAAGCTGACC GTCCTAGGT (SEQ ID NO:53)  
 v v f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:54)

**Fig. 7C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

(SEQ ID NO:55) (SEQ ID NO:17)  
 1 NFMLTQPHSV SESP<sup>GKT</sup>VTI SCTGSSGSIA SNYVQWYQQR PGSAPT<sup>T</sup>VIIY EDNQRPSGVP  
 61 DRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTEDEADYY CQSYDSSNQE VVFGG<sup>T</sup>TKLT VLG (SEQ ID  
 NO:54) (SEQ ID NO:56)

**Fig. 7D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATGGT
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g
301 AGCAGTGGCT GGTACGTACC ACACTGGTTC GACCCCTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTCACC
   s s g w y v p h w f d p w g q g t l v t
361 GTCTCGAGT (SEQ ID NO:57)
   v s s (SEQ ID NO:58)

```

**Fig. 8A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                                     (SEQ ID NO:3)          (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDG SSGWYVPHWF DPWGQGTIVT
121 VSS (SEQ ID NO:58)                                     (SEQ ID NO:5)

```

**Fig. 8B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTTACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CAGCATTGTC AGCAACTATG TACAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s s g s i v s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTT CCCCACCAC TGTGATCTAT GAGGATAACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s s p t t v i y e d n q r p s g v p
181 GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   d r f s g s i d s s s n s a s l t i s g
241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGATAGCAA CAATTTTGG
   l k t e d e a d y y c q s y d s n n f w
301 GTGTTCGGCG GAGGGACCAA GCTGACCGTC TAGGT (SEQ ID NO:59)
   v f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:60)

```

**Fig. 8C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                                     (SEQ ID NO:8)          (SEQ ID NO:17)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIV SNYVQWYQQR PGSSPTTVIY EDNQRPSGVP
61 DRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTEDEADYY CQSYDSNNFW VFGGGTKLTV LG (SEQ ID
NO:60)
                                     (SEQ ID NO:61)

```

**Fig. 8D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121  CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181  GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241  CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGT GAAAAGGTCC
   l q m n s l r a e d t a v y y c v k r s
301  TTTGATAGTG GTGGTCCTT TGAGTACTGG GGCCAGGGGA CAATGGTCAC
   f d s g g s f e y w g q g t m v
351  CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:62)
   t v s s (SEQ ID NO:63)

```

**Fig. 9A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)           (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61  ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCVKRS FDSGGSFEYW GQGTMTVSS (SEQ
ID NO:63)                               (SEQ ID NO:64)

```

**Fig. 9B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTCACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CTACATTGCC AGCTCCTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s s g y i a s s y v q w y q q r
121  CCGGGCAGTT CCCCCACCAC TGTAATCTTT GAGGATGACC GGAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s s p t t v i f e d d r r p s g v p
181  GATCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACGGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   d r f s g s i d g s s n s a s l t i s g
241  CTGAGGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGATGACAC CACTCCCTGG
   l r t e d e a d y y c q s y d d t t p w
301  GTGTTCGGCG GAGGGACCAA GCTGACCGTC CTAGGT (SEQ ID NO:65)
   v f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:66)

```

**Fig. 9C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:8)           (SEQ ID NO:25)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGYIA SSYVQWYQOR PGSSPTTVIF EDDRRPSGVP
61  DRFSGSIDGS SNSASLTISG LRTEDEADYY CQSYDDITPW VFGGGTKLTV LG (SEQ ID NO:66)
                               (SEQ ID NO:26)

```

**Fig. 9D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGTCGGC
   l q m n s l r a e d t a v y y c a r v g
301 AGCTGGTACC TGAAGATTT TGATATCTGG GGCCGGGGGA CAATGGTCAC
   s w y l e d f d i w g r g t m v
351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:67)
   t v s s (SEQ ID NO:68)

```

**Fig. 10A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)      (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARVG SWYLEDFDIW GRGTMVTVSS (SEQ
ID NO:68)                               (SEQ ID NO:69)

```

**Fig. 10B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTTACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CAGCATTGCC AGCAACTATG TTCACTGGTA TCAGCAGCGC
   s c t r s s g s i a s n y v h w y q q r
121 CCGGGCAGTT CACCCACCAC TGTGATCTAT GAGGATAACC GAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s s p t t v i y e d n r r p s g v p
181 GCTCGGTTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   a r f s g s i d s s s n s a s l t i s g
241 CTGGAGACTG ACGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT CTGATACCAC CTATCATGGA
   l e t d d e a d y y c q s s d t t y h g
301 GGTGTGGTAT TCGGCGGAGG GACCAAGCTG ACCGTCCTAG GT (SEQ ID NO:70)
   g v v f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:71)

```

**Fig. 10C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:72)      (SEQ ID NO:9)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIA SNYVHWYQQR PGSSPTTVIY EDNRRPSGVP
61 ARFSGSIDSS SNSASLTISG LETDDEADYY QSSDITYHG GVVFGGGTKL TVLG (SEQ ID NO:71)
                               (SEQ ID NO:73)

```

**Fig. 10D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAAGGCGGT
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k g g
301 AACTACGGTG ATTACTTCGA CTACTTTGAC TACTGGGGCA GAGGGACAAT GGTCACCGTC
   n y g d y f d y f d y w g r g t m v t v
361 TCGAGT (SEQ ID NO:74)
   s s (SEQ ID NO:75)

```

**Fig. 11A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)          (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61  ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKGG NYGDYFDYFD YWGRGTMVTV
121 SS (SEQ ID NO:75)                               (SEQ ID NO:76)

```

**Fig. 11B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CAGCATTGCC AGCAATTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s s g s i a s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTG CCCCCACCAT TGTGATCTAT GAAGATAACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s a p t i v i y e d n q r p s g v p
181 CATCGGTCTT CTGGCTCCAT CGACAGTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   h r f s g s i d s s n s a s l t i s g
241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT ATGAGGGGTT CGGCGGAGGG
   l k t e d e a d y y c q s y e g f g g g
301 ACCAAGCTGA CCGTCCTAGG T (SEQ ID NO:77)
   t k l t v l g (SEQ ID NO:78)

```

**Fig. 11C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:16)          (SEQ ID NO:17)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCTRSSGSIA SNYVQWYQQR PGSAPTIVY EDNQRPSGVP
61  HRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTEDEADYY QSYEGFGGG TKLTVLG (SEQ ID NO:78)
                               (SEQ ID NO:79)

```

**Fig. 11D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACTATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAAGATGGA
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g
301 TGGAACGCGC TGGGATGGCT TGAATCCTGG GGCCAGGGGA CAATGGTCAC
   w n a l g w l e s w g q g t m v
351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:80)
   t v s s (SEQ ID NO:81)

```

**Fig. 12A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)      (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCAKDG WNALGWLESW GQGTMTVSS (SEQ
ID NO:81)                               (SEQ ID NO:29)

```

**Fig. 12B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGAACTCAGCC CCACGCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTGACCATT
   n f m l t q p h a v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCG GCAGAAATGG CAACATTGCC AGCAACTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t g r n g n i a s n y v q w y q q r
121 CCGGACAGTG CCCCCACCCT TATAATCTTT GAAGATACCC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p d s a p t l i i f e d t q r p s g v p
181 ACTCGGCTCT CAGGCTCCAT CGACACCTCC TCCAATCTG CCTCCCTCAT CATCTCTTCA
   t r l s g s i d t s s n s a s l i i s s
241 TTGAGGACTG AGGACGAGGC TGATTACTAC TGTCAATCTT CTGATTCCAA CAGGGTGCTG
   l r t e d e a d y y c q s s d s n r v l
301 TTCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCCTA GGT (SEQ ID NO:82)
   f g g g t k v t v l g (SEQ ID NO:83)

```

**Fig. 12C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:84)      (SEQ ID NO:85)
1  NFMLTQPHAV SESPGKTVTI SCTGRNGNIA SNYVQWYQOR PDSAPTLIIF EDTORPSGVP
61 TRLSGSIDTS SNSASLISS LRTEDEADYY CQSSDSNRVL FGGGTKVTVL G (SEQ ID NO:83)
                               (SEQ ID NO:86)

```

**Fig. 12D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTGGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61  TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAAGATTTT
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d f
301 TGGGTTATTA CGAGTGGGAA TGACTACTGG GGGCGGGGGA CCACGGTCAC
   w v i t s g n d y w g r g t t v
351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:87)
   t v s s (SEQ ID NO:88)

```

**Fig. 13A**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)      (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDF WVITSGNDYW GRGTTVTVSS
   (SEQ ID NO:88)                               (SEQ ID NO:89)

```

**Fig. 13B**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGA2CTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTGACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61  TCCTGCACCC GCAGCAGTGG CAGCATTGCT AGCAATTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c t r s s g s i a s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTT CCCCACCAC TGTGATCTTT GAAGATAACC GAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s s p t t v i f e d n r r p s g v p
181 GATCGGTTTT CTGGCTCCAT CGACACCTCC TCCA2ACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   d r f s g s i d t s s n s a s l t i s g
241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAGTCTT TTGATAGCAC CAATCTTG2TG
   l k t e d e a d y y c q s f d s t n l v
301 GTGTTCGGCG GAGGGACCAA GCTGACCGTC CTAGGT (SEQ ID NO:90)
   v f g g g t k l t v l g (SEQ ID NO:91)

```

**Fig. 13C**

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:16)      (SEQ ID NO:9)
1  NFMLTQPHSV SESP2GKTVTI SCTRSSGSIA SNYVOWYQQR PGSSPTTVIF EDNRRPSGVP
61 DRFSGSIDTS SNSASLTISG LKTEDEADYY QSF2DSTNLV VFGGGTKLTV LG (SEQ ID NO:91)
   (SEQ ID NO:92)

```

**Fig. 13D**

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH**

```

1  GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
   e v q l l e s g g g l v q p g g s l r l
61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
   s c a a s g f t f s s y a m s w v r q a
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
   p g k g l e w v s a i s g s g g s t y y
181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
   a d s v k g r f t i s r d n s k n t l y
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAAAGATGGA
   l q m n s l r a e d t a v y y c a k d g
301 TGAACGCGC TGGGATGGCT TGAATCCTGG GGAAGGGGA CCACGGTCAC
   w n a l g w l e s w g k g t t v
351 CGTCTCGAGT (SEQ ID NO:93)
   t v s s (SEQ ID NO:94)

```

Fig. 14A

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VH**

```

                               (SEQ ID NO:3)           (SEQ ID NO:4)
1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKLEWVSA ISGSGGSTYY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDG WNALGWLESW GKGTITVTVSS (SEQ
ID NO:94)                               (SEQ ID NO:29)

```

Fig. 14B

**SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL**

```

1  AATTTTATGC TGACTCAGCC CCACTCTGTG TCGGAGTCTC CGGGGAAGAC GGTAACCATC
   n f m l t q p h s v s e s p g k t v t i
61 TCCTGCGCCG GCAGCAGTGG CAGCATTGCC AGCAACTATG TGCAGTGGTA CCAGCAGCGC
   s c a g s s g s i a s n y v q w y q q r
121 CCGGGCAGTG CCCCCACCGC TGTGATCTAT GAGGATAACC AAAGACCCTC TGGGGTCCCT
   p g s a p t a v i y e d n q r p s g v p
181 GATCGATTCT CTGGCTCCAT CGACAGCTCC TCCAACTCTG CCTCCCTCAC CATCTCTGGA
   d r f s g s i d s s s n s a s l t i s g
241 CTGAAGACTG AGGACGAGGC TGACTACTAC TGTCAATCTT ACTCTTACAA CAATCAGGTC
   l k t e d e a d y y c q s y s y n n q v
301 GTGTTCGCGCG GAGGGACCAA GGCACCGTC CTAGGT (SEQ ID NO:95)
   v f g g g t k v t v l g (SEQ ID NO:96)

```

Fig. 14C

**SECUENCIA DE PROTEÍNA DE VL**

```

                               (SEQ ID NO:97)           (SEQ ID NO:17)
1  NFMLTQPHSV SESPGKTVTI SCAGSSGSIA SNYVQWYQQR PGSAPTAVIY EDNORPSGVP
61 DRFSGSIDSS SNSASLTISG LKTEDEADYY CQSYSYNNQV VFGGGTKVTV LG (SEQ ID NO:96)
                               (SEQ ID NO:98)

```

Fig. 14D

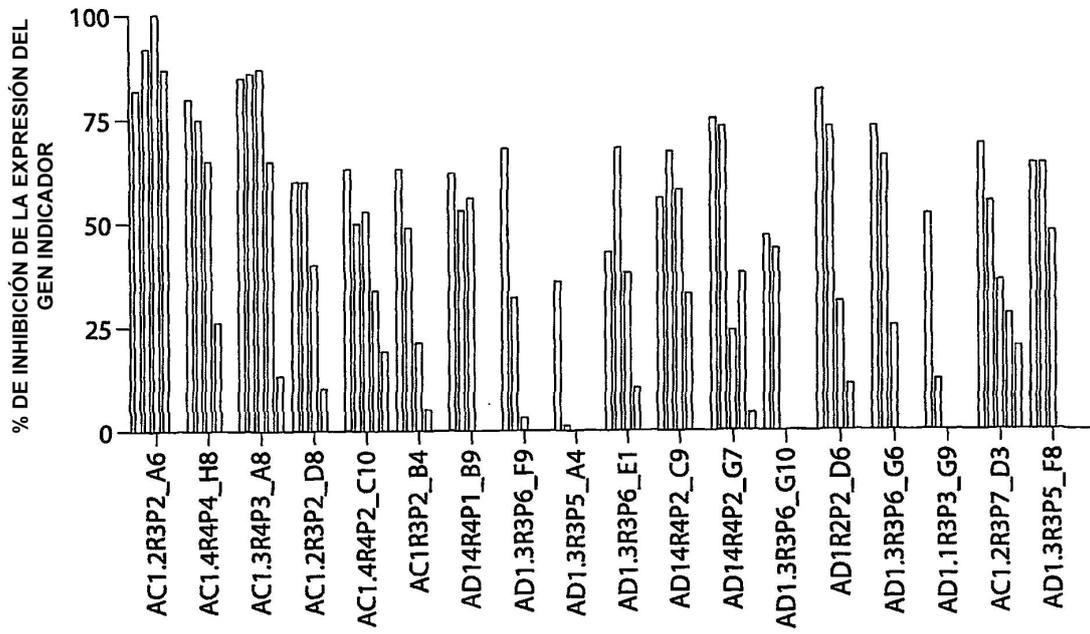


Fig. 15

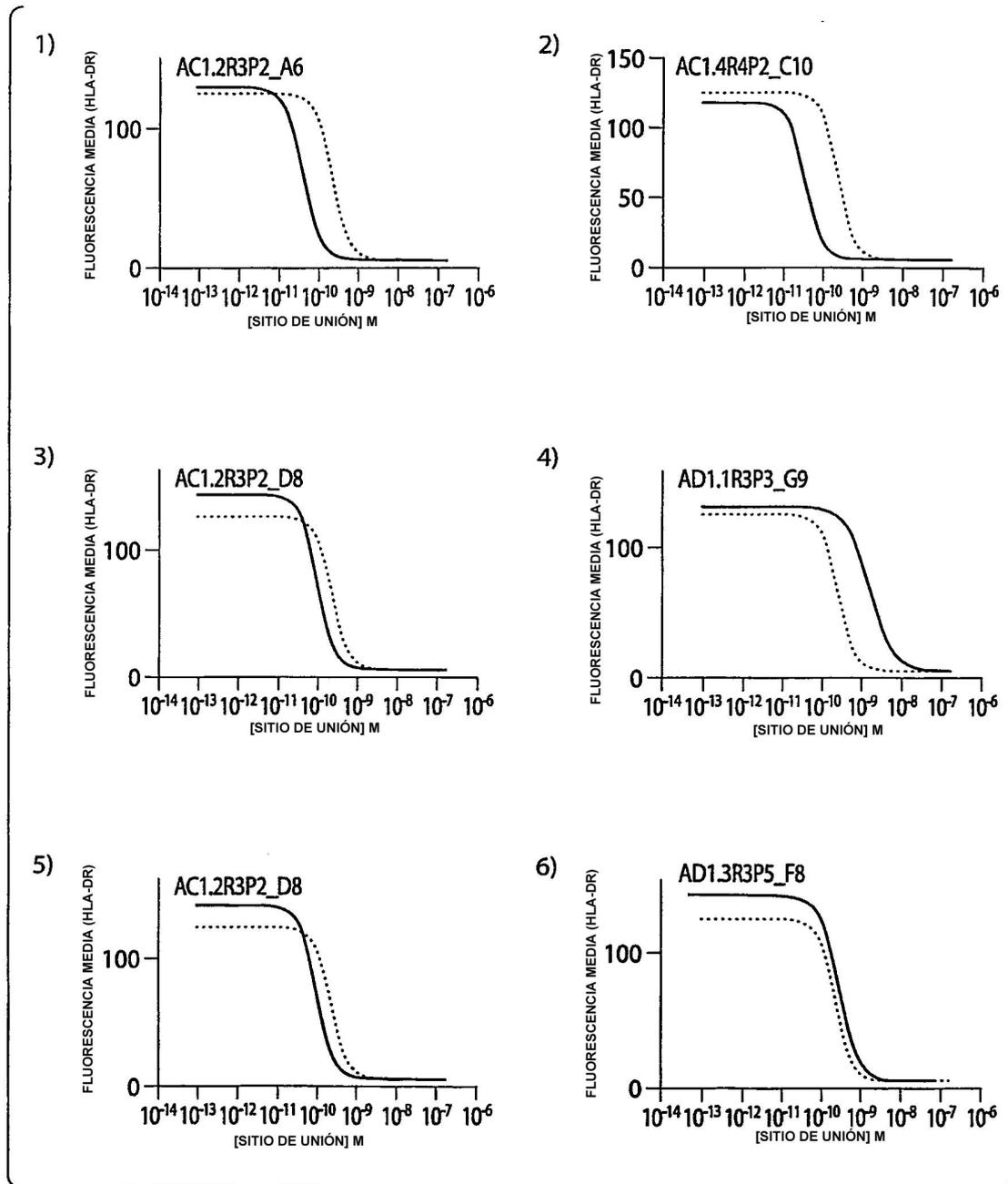


Fig. 16

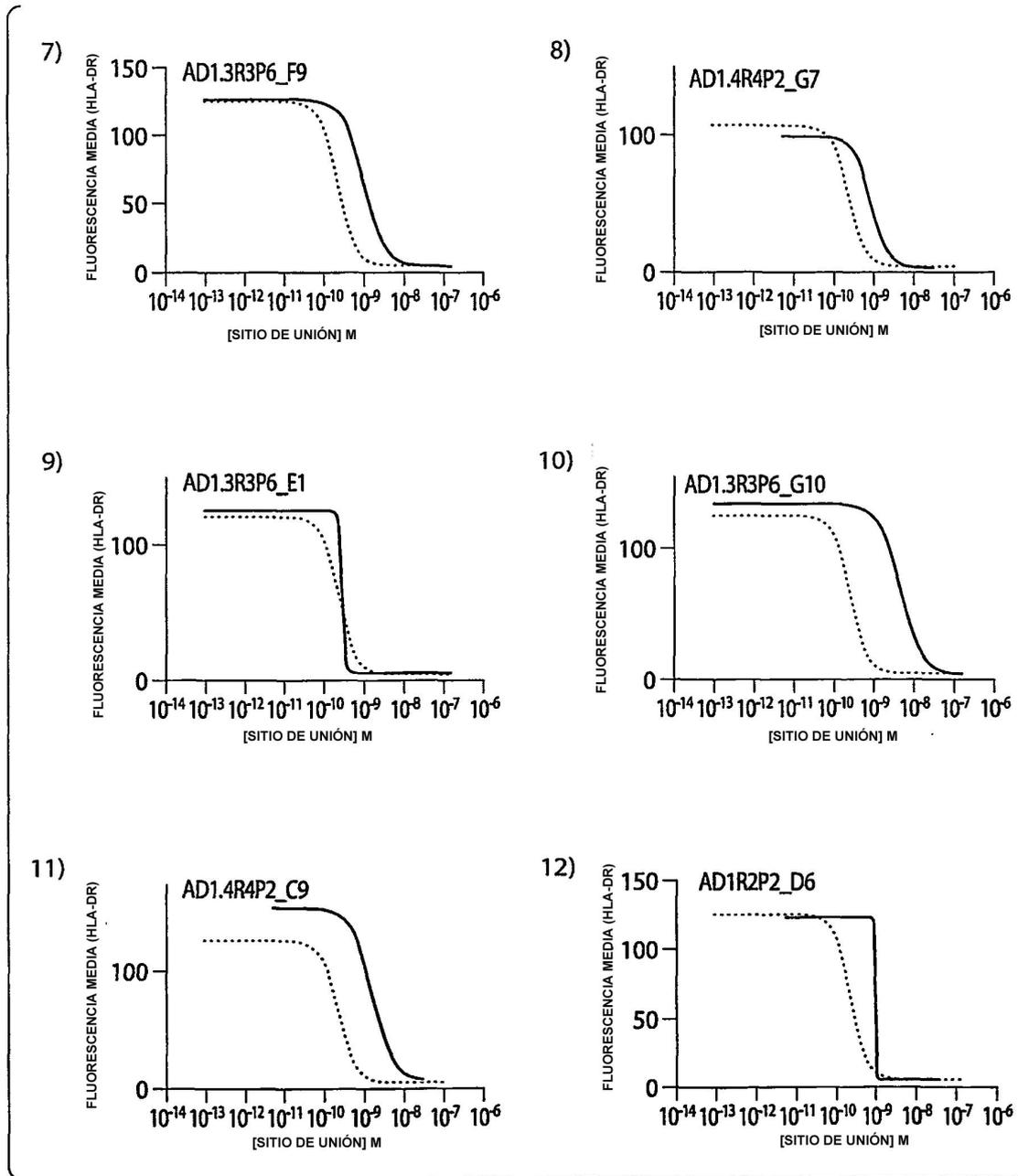


Fig. 16 Cont.

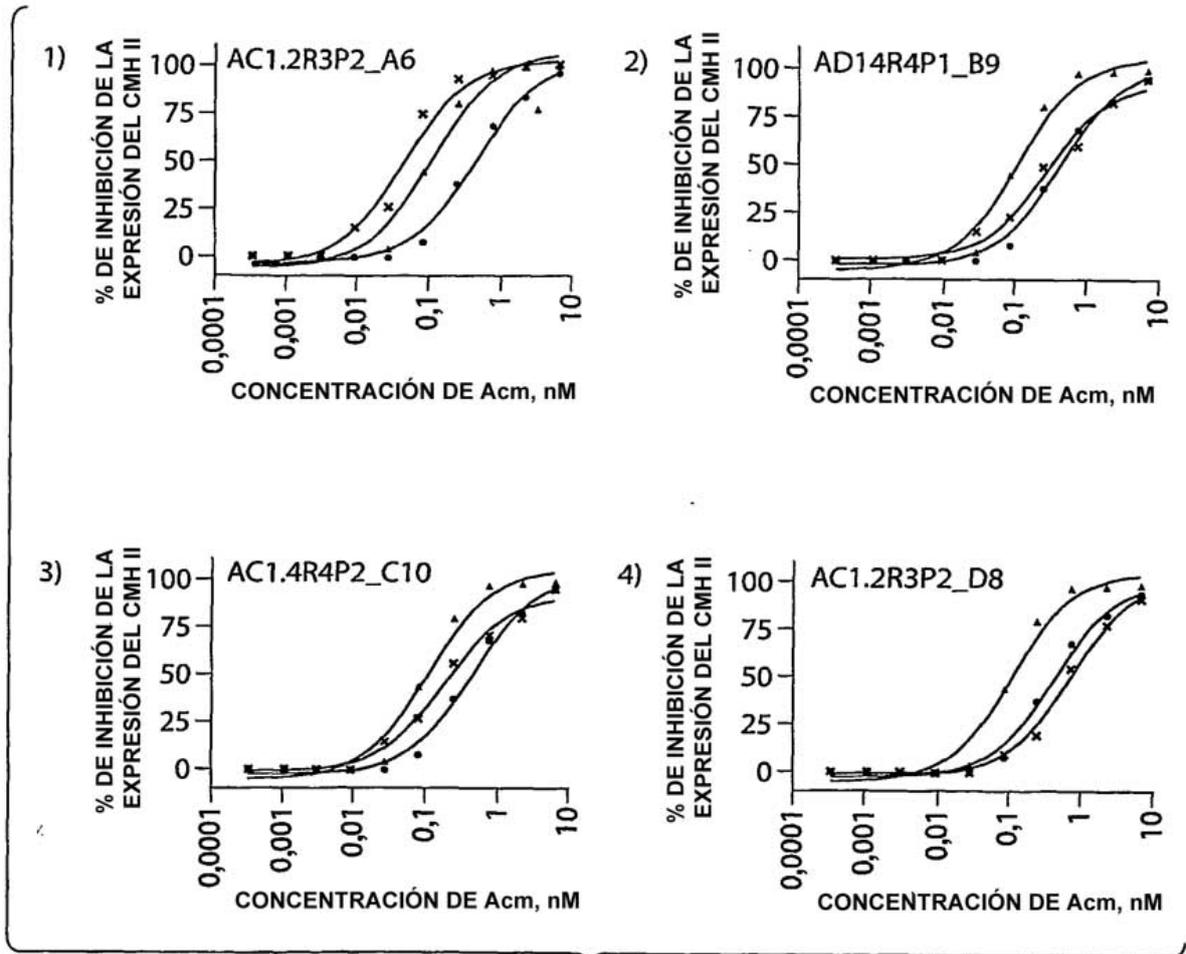


Fig. 17

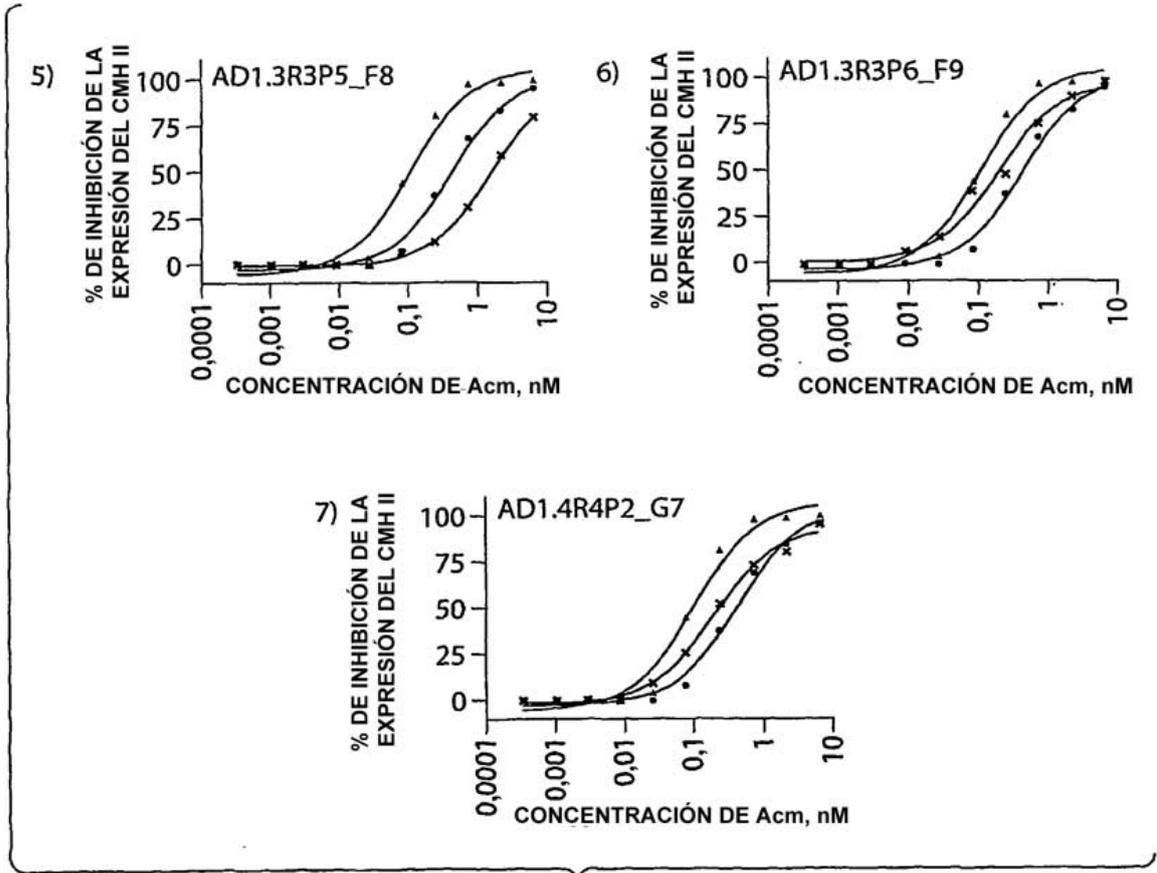


Fig. 17 Cont.

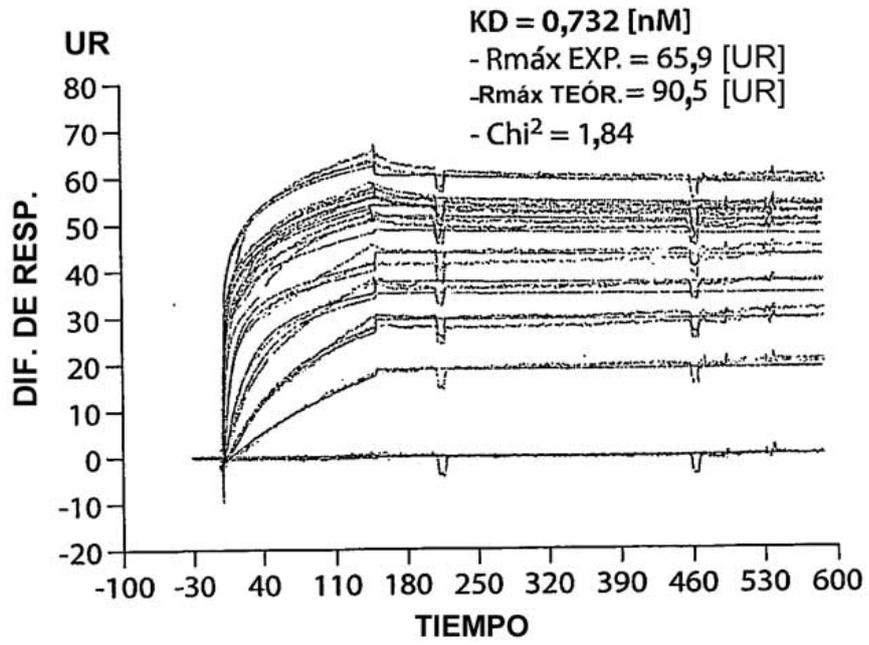


Fig. 18

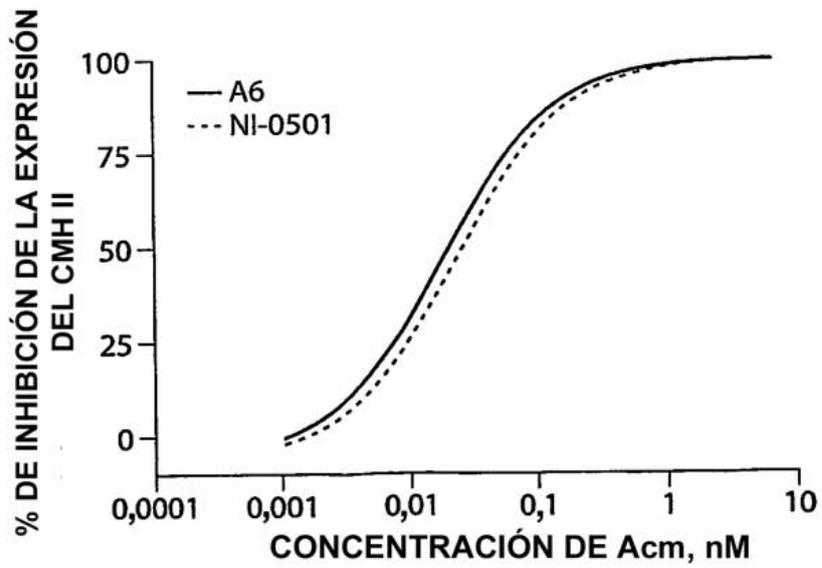
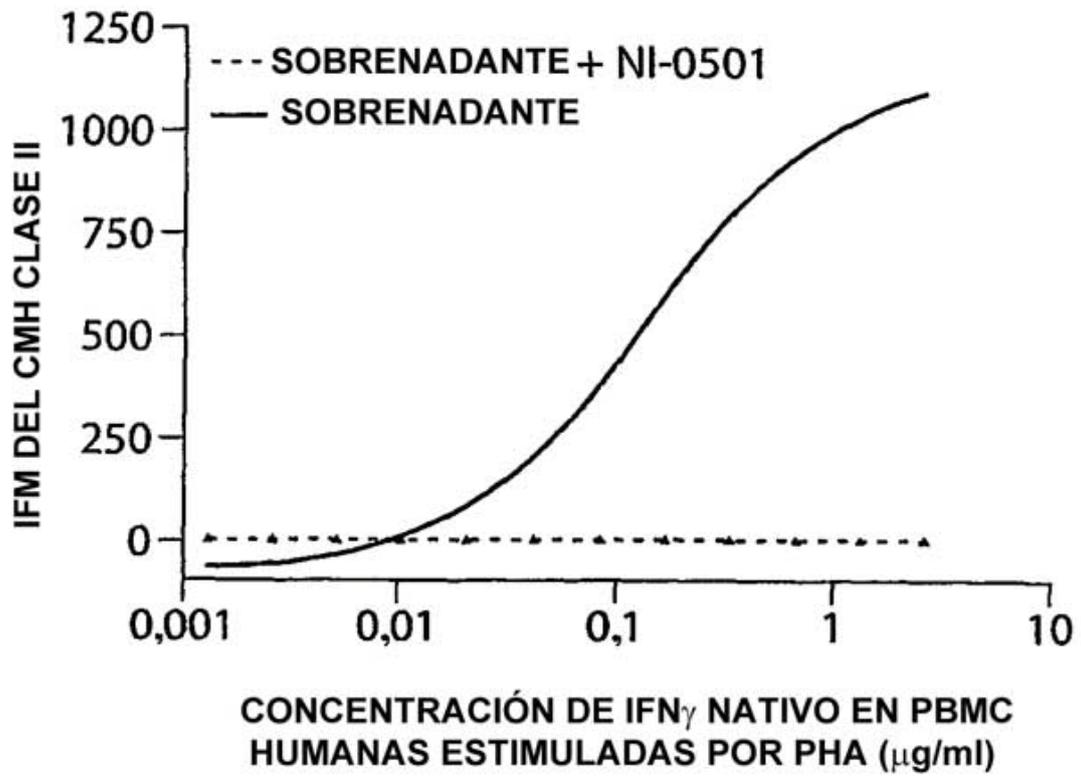


Fig. 19



**Fig. 20**

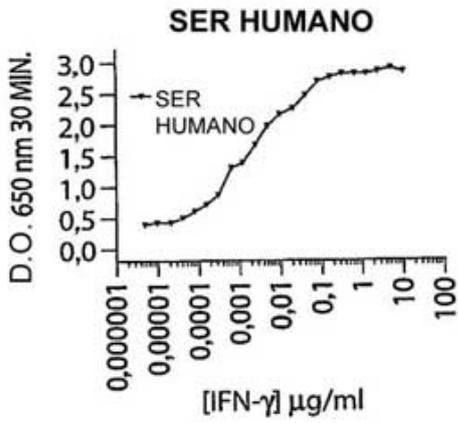


Fig. 21A

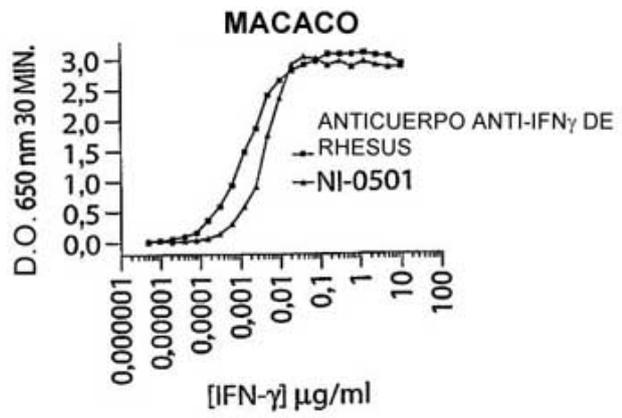


Fig. 21B

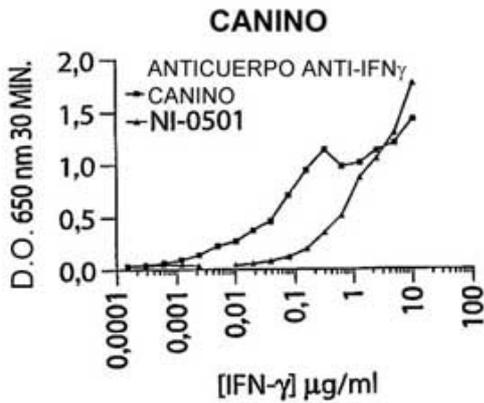


Fig. 21C

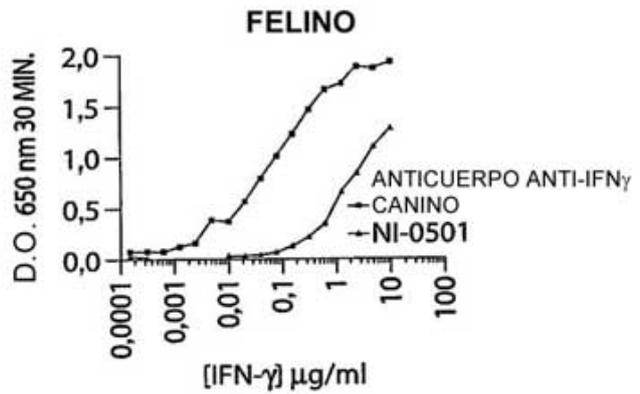


Fig. 21D

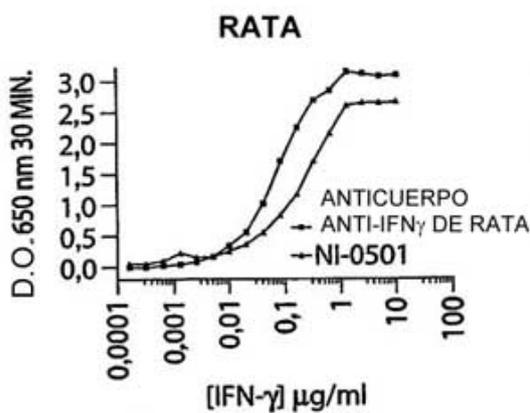


Fig. 21E

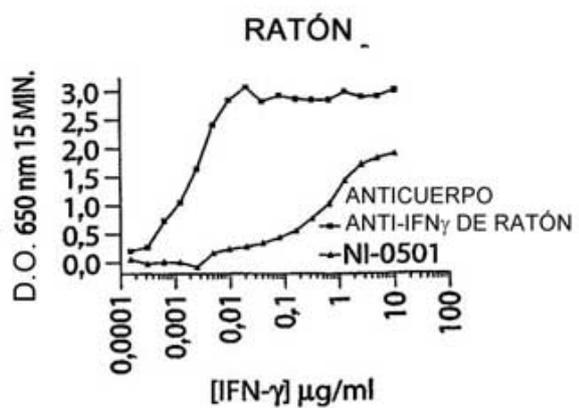


Fig. 21F

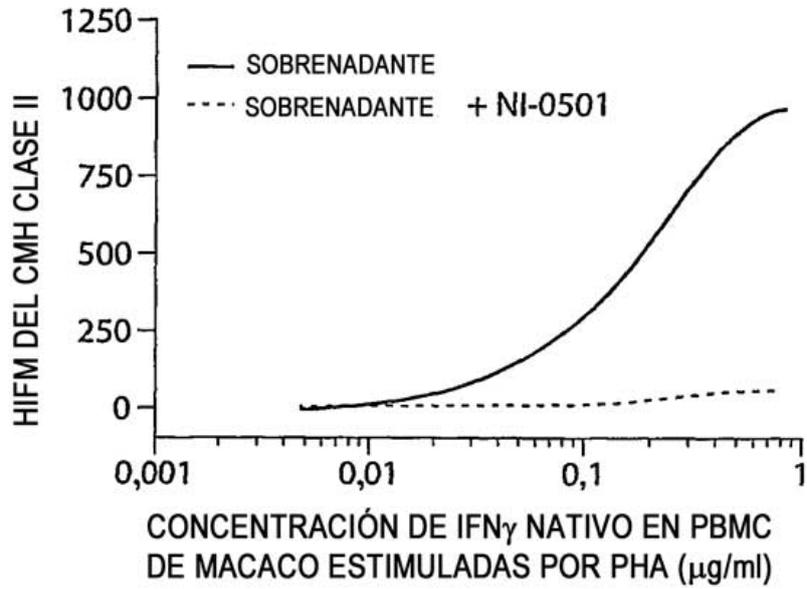


Fig. 22

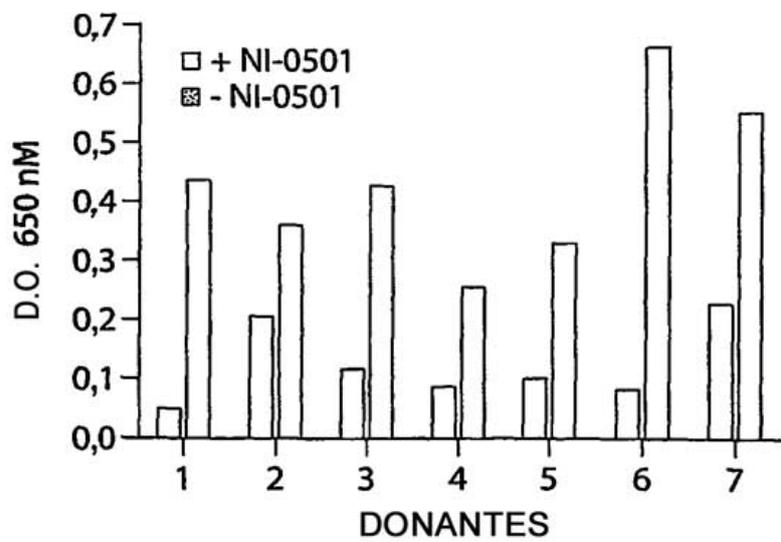


Fig. 23