

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 050**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2004** **E 04814015 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 1711207**

54 Título: **Anticuerpos contra interferón alfa y sus usos**

30 Prioridad:

10.12.2003 US 528757 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2013

73 Titular/es:

**MEDAREX, INC. (100.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08543-4000 , US**

72 Inventor/es:

**WITTE, ALISON;
WILLIAMS, DENISE;
CARDARELLI, JOSEPHINE, M.;
KING, DAVID y
PASSMORE, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 050 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 contra interferón alfa y sus usos

Antecedentes de la invención

los interferones de tipo I (IFN) (IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- τ) son una familia de citoquinas estructuralmente relacionadas que tienen efectos antivirales, antitumorales e inmunomoduladores (Hardy y col. (2001) Blood 97:473; Cutrone y Langer (2001) J. Biol. Chem. 276:17140). El locus IFN α humano incluye dos subfamilias. La primera subfamilia consta de al menos 14 genes no alélicos y 4 pseudogenes que tienen al menos un 75% de homología. La segunda subfamilia, α II u omega (ω), contiene 5 pseudogenes y un gen funcional que muestra un 70% de homología con los genes IFN α . Los subtipos de IFN α tienen diferentes actividades específicas pero tienen el mismo espectro biológico (Streuli y col. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2848) y tienen el mismo receptor celular (Agnat M. y col. (1983) en "Interferon 5" Ed. I. Gresser pág. 1-22, Academic Press, Londres).

Todos los interferones humanos tipo I se unen a un receptor de superficie celular (receptor de IFN alfa, IFNAR) que consta de dos proteínas transmembrana, IFNAR-1 e IFNAR-2 (Uze y col. (1990) Cell 60:225; Novick y col. (1994) Cell 77:391; Pestka y col. (1987) Annu Rev. Biochem. 56:727; Mogensen y col. (1999) J. Interferon Cytokine Res. 19:1069). IFNAR-1 es esencial para la unión de alta afinidad y la especificidad diferencial del complejo IFNAR (Cutrone (2001) *supra*). Aunque no se han identificado las diferencias funcionales para cada uno de los subtipos de IFN tipo I se cree que cada uno puede mostrar diferentes interacciones con los componentes del receptor IFNAR conduciendo a resultados de señalización potencialmente diversos (Cook y col. (1996) J. Biol. Chem. 271:13448). En particular, estudios utilizando formas mutantes de IFNAR-1 e IFNAR-2 sugirieron que los interferones alfa y beta señalizan de forma diferente a través del receptor por interacción diferencial con cadenas respectivas (Lewerenz y col. (1998) J. Mol. Biol. 282:585).

Estudios funcionales previos de IFN de tipo I se centraron en la defensa innata contra infecciones virales (Haller y col. (1981) J. Exp. Med. 154:199; Lindenmann y col. (1981) Methods Enzymol. 78:181). Estudios más recientes, sin embargo, implican los IFN de tipo I como citoquinas inmunoregulatoras potentes en la respuesta inmune adaptativa. Específicamente, las IFN de tipo I han demostrado facilitar la diferenciación de células T vírgenes a lo largo de la vía Th1 (Brinkmann y col. (1993) J. Exp. Med. 178:1655), potencia la producción de anticuerpos (Finkelman y col. (1991) J. Exp. Med. 174:1179) y da soporte a la actividad funcional y supervivencia de las células T de memoria (Santini, y col. (2000) J. Exp. Med. 191:1777; Tough y col. (1996) Science 272:1947).

Un trabajo reciente por varios grupos sugiere que INF- α puede potenciar la maduración o activación de células dendríticas (DC) (Santini, y col. (2000) J. Exp. Med. 191:1777; Luft y col. (1998) J. Immunol. 161:1947; Luft y col. (2002) Int. Immunol. 14:367; Radvanyi y col (1999) Scand. J. Immunol. 50:499; Paquette y col. (1998) J. Leukoc. Biol. 64:358). Además, la expresión aumentada de interferones de tipo I se ha descrito en numerosas enfermedades autoinmunes (Foulis y col. (1987) Lancet 2:1423; Hooks y col. (1982) Arthritis Rheum 25:396; Hertzog y col. (1988) Clin. Immunol. Immunopathol. 48:192; Hopkins y Meager (1988) Clin. Exp. Immunol. 73:88; Arvin y Miller (1984) Arthritis Rheum. 27: 582). La mayoría de los ejemplos estudiados de esto son diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) (Foulis (1987) *supra*), lupus sistémico eritematoso (SLE) (Hooks (1982) *supra*; Blanco y col. (2001) Science 294:1540; Ytterberg y Schnitzer (1982) Arthritis Rheum. 25:401; Batteux y col. (1999) Eur. Cytokine Netw. _:509), y tiroiditis autoinmune (Prummel y Laurberg (2003) Thyroid 13:547; Mazziotti y col. (2002) J. Endocrinol. Invest. 25:624; You y col. (1999) Chin. Med. J. 112:61; Koh y col. (1997) Thyroid 7:891), que están todas asociadas con niveles elevados de IFN α , y artritis reumatoide (RA) (Hertzog (1988), Hopkins y Meager (1988), Arvin y Miller (1984), *supra*) en que IFN- β puede desempeñar un papel más significativo.

Además, se ha informado de que la administración de interferón α exacerba la enfermedad subyacente en pacientes con psoriasis, tiroiditis autoinmune y esclerosis múltiple e induce el síndrome tipo SLE en pacientes sin antecedentes previos de enfermedad autoinmune. El interferón α también ha demostrado inducir glomerulonefritis en ratones normales y acelerar la aparición de la enfermedad autoinmune espontánea de ratones NZB/W. además, la terapia con IFN- α ha demostrado en algunos casos conducir a efectos secundarios indeseados, incluyendo fiebre y trastornos neurológicos. Por tanto, existen situaciones patológicas en que podría ser beneficiosa la inhibición de la actividad IFN- α para el paciente y existe la necesidad de agentes eficaces en la inhibición de la actividad IFN- α .

El documento US 203/0166228 A1 describe la generación de anticuerpos monoclonales neutralizantes anti IFN- α con reactividad contra diversos subtipos de IFN- α .

Tsukui y col. (Microbiology and Immunology, Vol. 30, N° 11, 1986, páginas 1129-1139) describe un anticuerpo monoclonal con reactividad contra los subtipos de interferón- α humano útiles para la purificación de interferón derivado de leucocitos.

Meager y col. (Journal of Interferon Research, Vol. 6, N° 6, 1986, páginas 729-736) describe un anticuerpo monoclonal, LO-22, con especificidad por subtipos de interferón- α .

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado anti-interferón alfa, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 5 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 1;
 (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 4;
 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 7;
 (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 10;
 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 13; y
 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 16.

10 La presente invención también proporciona:

- un anticuerpo monoclonal aislado anti-interferón alfa, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 34, 35, 36 y 37; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22;
- 15 - una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención;
- un inmunocombinado que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, unido a un agente terapéutico;
- una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que dicho anticuerpo, o parte
- 20 de unión a antígeno del mismo;
- una composición que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, o el inmunocombinado de la invención, o la molécula biespecífica de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- una molécula de ácido nucleico aislada que codifica al anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la
- 25 invención, un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico, o una célula huésped aislada que comprende dicho vector;
- un ratón transgénico que comprende los transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en que el ratón expresa el anticuerpo de la invención, o un hibridoma preparado a partir de dicho ratón, en que el hibridoma produce dicho anticuerpo;
- 30 - un procedimiento *ex vivo* para inhibir la actividad biológica de interferón alfa que comprende poner en contacto el interferón alfa con el anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención, de modo que se inhiba la actividad biológica del interferón alfa;
- un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención para su uso como medicamento;
- un anticuerpo parte de unión a antígeno de la invención para su uso en un método de tratamiento de una
- 35 enfermedad o trastorno mediado por interferón alfa en un sujeto en necesidad de tratamiento:

El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención puede comprender:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID N°19; y
- (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°22.

40 El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención puede inhibir la expresión superficial inducida por IFN de CD38 o MHC Clase I en células mononucleares de sangre periférica; y/o inhibir la expresión inducida por IFN de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica; y/o inhibir el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma de lupus sistémico eritematoso (SLE).

45 El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado. El anticuerpo parte de unión a antígeno de la invención puede ser un anticuerpo IgG1 o IgG4. La parte de unión a antígeno de la invención puede ser un fragmento de anticuerpo Fab o un anticuerpo de cadena sencilla (scFv).

50 La enfermedad o trastorno que puede tratarse por el uso del anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención puede ser lupus sistémico eritematoso; o puede seleccionarse entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus insulino dependiente, psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide y glomerulonefritis; o puede ser rechazo de trasplantes o la enfermedad de injerto contra huésped.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos, que no deben entenderse como limitantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 25) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°

19) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 13H5. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 1), CDR2 (SEC ID N° 4) y CDR3 (SEC ID N° 7) están señaladas y las derivaciones de línea germinal V, D y J están indicadas.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 28) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 22) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 13H5. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 10), CDR2 (SEC ID N° 13) y CDR3 (SEC ID N° 16) están señaladas y las derivaciones de línea germinal V y J están indicadas.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 26) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 20) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 13H7. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 2), CDR2 (SEC ID N° 5) y CDR3 (SEC ID N° 8) están señaladas y las derivaciones de línea germinal V, D y J están indicadas.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 29) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 23) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 13H7. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 11), CDR2 (SEC ID N° 14) y CDR3 (SEC ID N° 17) están señaladas las derivaciones de línea germinal V y J están indicadas.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 27) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 21) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 7H9. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 3), CDR2 (SEC ID N° 6) y CDR3 (SEC ID N° 9) están señaladas y las derivaciones de línea germinal V, D y J están indicadas.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 30) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 24) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 7H9. Las regiones CDR1 (SEC ID N° 12), CDR2 (SEC ID N° 15) y CDR3 (SEC ID N° 18) están señaladas y las derivaciones de línea germinal V y J están indicadas.

La Figura 4 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13H5 (SEC ID N° 19) y 7H9 (SEC ID N° 21) con la secuencia de aminoácidos de VH 1-18 de línea germinal humana (SEC ID N° 31).

La Figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13H7 (SEC ID N° 20) con la secuencia de aminoácidos VH 4-61 de línea germinal humana (SEC ID N° 32).

La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 13H5 (SEC ID N° 22), 13H7 (SEC ID N° 23) y 7H9 (SEC ID N° 24) con la secuencia de aminoácidos de VK A27 de línea germinal humana (SEC ID N° 33).

La Figura 7 es un gráfico que muestra la competición de unión de ^{125}I -IFN α 2a a células Daudi que expresan IFNAR por IFN α 2a no marcado (●) frente a la potenciación de ^{125}I -IFN α 2a que se une por mAb 13H5 (▼). Un anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto sobre la unión (◆).

La Figura 8 es un gráfico que muestra la unión de ^{125}I -13H5 a células Daudi en presencia de IFN α 2a (■) pero no en ausencia de IFN α 2a (▲). La unión dependiente de IFN α específica de 13H5 está representada por círculos (●).

La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos ADCC de lisis de células Raji por células mononucleares humanas frescas en presencia de 13H5 (■), 13H5 + IFN α (▲), un anticuerpo de control de isotipo + IFN α (▼), o un anticuerpo de control positivo (●). La lisis se observó solamente con el control positivo.

Descripción detallada de la invención

En este documento se describen anticuerpos monoclonales aislados que se unen a IFN alfa y que son capaces de inhibir la actividad biológica de múltiples subtipos de IFN alfa, pero no la actividad biológica del subtipo 21 de IFN alfa, o IFN beta o IFN omega. Los anticuerpos pueden ser capaces de inhibir la expresión superficial de marcadores celulares inducidos por IFN alfa, inhibir la expresión de IP-10 inducida por IFN alfa e inhibir el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma de pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE). La invención proporciona anticuerpos aislados, procedimientos para preparar dichos anticuerpos, inmunocombinados y moléculas biespecíficas que comprenden dichos anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunocombinados o moléculas biespecíficas de la invención. La invención también se refiere a procedimientos para usar los anticuerpos para inhibir la actividad de IFN alfa, por ejemplo en el tratamiento de trastornos autoinmunes, o para inhibir o prevenir el rechazo de trasplantes o en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Durante toda la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

Las expresiones "interferón alfa" e "IFN alfa" se usan de forma intercambiable y pretenden hacer referencia a proteínas IFN alfa codificadas por un gen funcional del locus del gen interferón alfa con un 75% o mayor identidad de secuencia con IFN alfa I (número de Genbank NP_076918 o proteína codificada por el número de Genbank NM_024013). Los ejemplos de subtipos de IFN alfa incluyen IFN alfa 1, alfa 2a, alfa 2b, alfa 4, alfa 5, alfa 6, alfa 7, alfa 8, alfa 10, alfa 13, alfa 14, alfa 16, alfa 17 y alfa 21. La expresión "interferón alfa" pretende abarcar formas recombinantes de los diversos subtipos de IFN alfa, así como preparaciones de origen natural que comprenden proteínas IFN alfa, tal como IFN de linfocitos e IFN linfoblastoide. La expresión IFN alfa no pretende abarcar IFN omega individualmente, aunque una composición que comprenda tanto IFN alfa como IFN omega está abarcada por la expresión IFN alfa.

La expresión "receptor de IFN alfa" como se usa en este documento pretender hacer referencia a miembros de la familia del receptor de IFN alfa de moléculas que son receptores para el ligando IFN alfa. Ejemplos de receptores de IFN alfa son receptor 1 de IFN alfa y receptor 2 de IFN alfa.

La expresión "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores y el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y el complemento) que provoca el daño selectivo de, la destrucción de, o la eliminación en el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que desempeñan una tarea en la transmisión de una señal desde una parte de una célula a otra parte de la misma. Como se usa en este documento, la expresión "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor 1 de IFN alfa o el receptor 2 de IFN alfa.

El término "anticuerpo" según se hace referencia en este documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas de aminoterminal a carboxiterminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IFN alfa). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios V_L y V_H de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col. (1989) Nature 341:544-546), que consta de un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes diferentes, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, por un enlazador sintético que le posibilite formarse como una única cadena proteica en que el par de regiones V_L y V_H formen moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science. 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden estar incluidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los especialistas en la técnica, y los fragmentos se exploran para su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, pretende indicar un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IFN alfa está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a IFN alfa). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a IFN alfa puede, sin embargo,

tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IFN alfa de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en este documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular individual. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones flanqueantes como CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se obtiene de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR obtenidas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tiene regiones variables en que tanto las regiones flanqueantes como CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en este documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y ajuste de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en que las regiones flanqueantes y CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se obtienen de y están relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en este documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de región constante de cadena pesada.

Como se usa en este documento, un anticuerpo que "inhibe la actividad biológica" de un subtipo de IFN alfa pretende indicar un anticuerpo que inhibe la actividad de ese subtipo en al menos un 10%, más preferible al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80%, en comparación con el nivel de actividad en ausencia del anticuerpo, por ejemplo, usando un ensayo funcional tal como los descritos en los ejemplos, tales como el ensayo de proliferación de células Daudi. Como alternativa, un anticuerpo que "inhibe la actividad biológica" de un subtipo de IFN alfa puede hacer referencia a un anticuerpo que inhibe la actividad de ese subtipo con una CE₅₀ de menos de 200 nM o menos, más preferiblemente 100 nM o menos, incluso más preferiblemente 50 nM o menos e incluso más preferiblemente 10 nM o menos.

Como se usa en este documento, un anticuerpo que "no inhibe sustancialmente la actividad biológica" de un subtipo de IFN alfa, o de IFN beta o IFN omega, pretende indicar un anticuerpo que inhibe la actividad de ese subtipo en menos del 10%, más preferiblemente en menos del 5% e incluso más preferiblemente en cantidades esencialmente indetectables. Como alternativa, un anticuerpo que "no inhibe la actividad biológica" de un subtipo de IFN alfa puede hacer referencia a un anticuerpo que inhibe la actividad de ese subtipo con una CE₅₀ de 300 nM o más.

Como se usa en este documento, "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10⁻⁸ M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es al menos dos veces menor que se K_D para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno muy relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de forma intercambiable en este documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

El término " K_{asoc} " o " K_a ", como se usa en este documento, pretende indicar la velocidad de asociación de la interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se usa en este documento, pretende indicar la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " K_d ", como se usa en este documento, pretende indicar la constante de disociación, que se obtiene de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_d para anticuerpos pueden determinarse usando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento preferido para determinar la K_d de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferiblemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

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

Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-IFN alfa

Los anticuerpos desvelados en este documento pueden caracterizarse por características y propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos puede unirse específicamente a múltiples subtipos de IFN alfa, tales como IFN alfa 2a e IFN alfa 2b. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención se une a IFN alfa 2a y/o alfa 2b con alta afinidad, por ejemplo con una K_D de 10^{-8} M o menos o 10^{-9} M o menos o incluso 10^{-10} M o menos. El anticuerpo puede unirse a IFN alfa 2a humano e IFN alfa 2b humano. La afinidad de unión y cinética de los anticuerpos de la invención pueden examinarse por, por ejemplo, análisis Biacore como se describe en los ejemplos.

Además, los anticuerpos pueden mostrar diversas propiedades funcionales. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser capaces de inhibir la actividad biológica de múltiples subtipos de IFN alfa pero pueden no inhibir sustancialmente la actividad biológica de IFN alfa 21. Los anticuerpos también pueden no inhibir sustancialmente la actividad biológica de IFN beta o IFN omega. Los anticuerpos también pueden ser capaces de inhibir la expresión superficial inducida por IFN de marcadores celulares, tales como CD38 o MHC de clase I, en células mononucleares de sangre periférica humana normal. Los anticuerpos también pueden ser capaces de inhibir la expresión inducida por IFN de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica humana normal. La inhibición de la actividad biológica de subtipos de IFN alfa, IFN beta y/o IFN omega puede evaluarse usando ensayos funcionales tales como los descritos en los ejemplos, tales como el ensayo de proliferación de células Daudi.

Aún más, los anticuerpos pueden ser capaces de inhibir el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma de pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE). El desarrollo de células dendríticas puede evaluarse examinando la expresión de marcadores de superficie celular, tales como CD38, MHC de clase I y/o CD123, como se describe en los ejemplos.

Un anticuerpo como se desvela en este documento puede inhibir la actividad biológica de IFN alfa por un mecanismo no competitivo de acción, es decir, el anticuerpo no compite por la unión de IFN alfa a IFNAR. En su lugar, dicho anticuerpo llega a asociarse con IFNAR de superficie celular en presencia de IFN alfa e inhibe la señalización celular a través de IFNAR. Un anticuerpo que tienen estas propiedades de unión puede no mostrar actividad ADCC significativa. Los ensayos para examinar estas propiedades funcionales del anticuerpo son conocidos en la técnica, tales como los ensayos descritos en los ejemplos 8 y 9. Por ejemplo, puede examinarse la capacidad del anticuerpo de inhibir la unión de IFN alfa radiomarcado a células que expresan IFNAR. La incapacidad del anticuerpo de inhibir la unión de IFN alfa radiomarcado a IFNAR es indicativo de un mecanismo no competitivo de acción. Para examinar adicionalmente este mecanismo de acción, puede ensayarse la unión de anticuerpo radiomarcado en presencia o ausencia de IFN alfa, a células que expresan IFNAR. La unión del anticuerpo radiomarcado a células que expresan IFNAR en presencia, pero no ausencia, de IFN alfa es indicativo de este mecanismo de acción.

Los anticuerpos desvelados en este documento pueden unirse al complejo IFN alfa-IFNAR con una afinidad mayor (por ejemplo, K_D) que a IFN alfa solo (uno o más subtipos) y/o a IFNAR solo. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse al complejo IFN alfa-IFNAR con una K_D de 10^{-8} M o mayor afinidad, una K_D de 10^{-9} M o mayor afinidad, o una K_D de 10^{-10} M o mayor afinidad.

Los anticuerpos desvelados en este documento pueden ser biespecíficos para IFN alfa (uno o más subtipos) e IFNAR (IFNAR1 y/o IFNAR2), lo que indica que los anticuerpos se asocian tanto con IFN alfa como con IFNAR (IFNAR1 y/o IFNAR2).

Por consiguiente, en este documento se desvelan moléculas biespecíficas que comprende al menos una primera especificidad de unión por IFN alfa y una segunda especificidad de unión por IFNAR1, en las que, por ejemplo, la segunda especificidad de unión por IFNAR1 puede formarse por la asociación del anticuerpo con IFN alfa. También se desvelan en ese documento moléculas biespecíficas que comprenden al menos una especificidad de unión por IFN alfa y una segunda especificidad de unión por IFNAR2, en las que, por ejemplo, la segunda especificidad de unión por IFNAR2 puede formarse por la asociación del anticuerpo con IFN alfa.

Anticuerpos monoclonales 13H5, 13H7 y 7H9

Un anticuerpo preferido es el anticuerpo monoclonal humano 13H5. Otros anticuerpos desvelados en este documento son los anticuerpos monoclonales humanos 13H7 y 7H9. Los anticuerpos se aislaron y caracterizaron estructuralmente como se describe en los ejemplos. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N° 19, 20, y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 13H5, 13H7, y 7H9 se muestran en las SEC ID N° 22, 23 y 24, respectivamente.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o parte unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°19; y
- (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22.

El anticuerpo típicamente inhibe la actividad biológica de interferón alfa.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 13H5. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N 1, 2, y 3. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N 4, 5 y 6. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N 7, 8, y 9. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_L de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N 10, 11, y 12. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_L de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N 13, 14, y 15. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_L de 13H5, 13H7 y 7H9 se muestran en las SEC ID N 16, 17, y 18. Las regiones CDR están señaladas usando el sistema de Kabat (Kabat. E.A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242).

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 1;
- (b) una CDR2 de región de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 4;
- (c) una CDR3 de región de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 7;
- (d) una CDR1 de región de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 10;
- (e) una CDR2 de región de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 13; y
- (f) una CDR3 de región de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 16.

Anticuerpos modificados con estabilidad aumentada

En otro aspecto, la invención proporciona formas modificadas del anticuerpo 13H5 que muestran estabilidad aumentada en comparación con 13H5 de tipo silvestre. Como se describe en detalle adicional en el ejemplo 10, el anticuerpo 13H5 contiene un sitio de desamidación en Asn-55 dentro de la CDR2 de la cadena V_H . La secuencia de aminoácidos en este sitio, de las posiciones 55 a 58 es N G N T (restos aminoácidos 55-58 de la SEC ID N° 19). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena V_H de 13H5 está mutada en la posición 55 de asparagina a un aminoácido diferente. Adicionalmente o como alternativa, las posiciones aminoácidas alrededor de Asn-55 que influyen en la desamidación pueden estar mutadas. Las sustituciones de aminoácidos preferidas en la posición 55 incluyen ácido aspártico y glutamina, siendo más preferida la glutamina. La secuencia de aminoácidos de 13H5 con una sustitución N55D se muestra en la SEC ID N° 34. La secuencia de aminoácidos de 13H5 con una sustitución N55Q se muestra en la SEC ID N° 35. En otra realización, también puede mutarse Asn-57 de la cadena V_H de 13H5, junto con la mutación de Asn-55. Una sustitución de aminoácido preferida en la posición 57 es glutamina. La secuencia de aminoácidos de 13H5 con las sustituciones N55Q y N57Q se muestra en la SEC ID N° 36. Estos tres anticuerpos mutados muestran estabilidad aumentada, en condiciones de desamidación forzada, en comparación con 13H5 de tipo silvestre, como se describe adicionalmente en el ejemplo 11.

En otra realización, la glicina en la posición aminoácida 56 está mutada en alanina (G56A), ya que se ha determinado a partir de péptidos modelo que la tasa de desamidación es aproximadamente 20 veces menor con una alanina adyacente a la asparagina, en lugar de una glicina adyacente a la alanina (véase, por ejemplo, Ahern, T. y Manning, M.C., ed. Stability of Protein Pharmaceuticals, Pharmaceutical Biotechnology, volumen 2, capítulo 1, páginas 1-30). Por tanto, la mutación G56A representa un equilibrio entre la reactividad disminuida y el cambio estructural mínimo en la secuencia de tipo silvestre, aumentando de este modo la estabilidad manteniendo al mismo tiempo la actividad. La secuencia de aminoácidos de 13H5 con una sustitución G56A se muestra en la SEC ID N°

37.

Por consiguiente, en diversas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo contra IFN alfa de la invención que tiene una sustitución de aminoácido en Asn-55, Gly-56 y/o Asn-57 de la CDR2 de la cadena V_H de 13H5, cuya secuencia de tipo silvestre se muestra expuesta en la SEC ID N° 19. Los anticuerpos mutados preferidos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 34, 35, 36 y 37. Preferiblemente, la cadena V_H del anticuerpo está apareada con la cadena V_K de 13H5, como se expone en la SEC ID N° 22.

Procedimientos para diseñar por ingeniería los anticuerpos

Como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos anti-IFN alfa que tienen secuencias V_H y V_L descritas en este documento pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-IFN alfa modificando las secuencias V_H y/o V_L, o la región o regiones constantes unidas a las mismas.

Las modificaciones incluyen las descritas en la sección previa. El material de partida para el procedimiento de diseño por ingeniería es una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado por ingeniería, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar en forma de proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. En su lugar, se usa la información contenida en la secuencia o secuencias como material de partida para crear una secuencia o secuencias de "segunda generación" derivadas de la secuencia o secuencias originales y después la secuencia o secuencias "de segunda generación" se preparan y expresan en forma de proteína.

En este documento también se desvela un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-IFN alfa que comprende:

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de la SEC ID N° 1; y/o una secuencia de aminoácidos de CDR2 de la SEC ID N° 4; y/o una secuencia de aminoácidos de CDR3 de la SEC ID N° 7; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de la SEC ID N° 10; y/o una secuencia de aminoácidos de CDR2 de la SEC ID N° 13; y/o una secuencia de aminoácidos de CDR3 de la SEC ID N° 16;
- (b) alterar al menos un resto aminoacídico dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada en forma de proteína.

Pueden usarse técnicas de técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferiblemente, el anticuerpo codificado por la secuencia o secuencias de anticuerpo alterado es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-IFN alfa descritos en este documento, con propiedades funcionales que incluyen, aunque sin limitación:

- (i) inhibir la actividad biológica de interferón alfa.
- (ii) inhibir la actividad biológica de múltiples subtipos de IFN alfa pero no inhibir sustancialmente la actividad biológica de IFN alfa 21;
- (iii) no inhibir sustancialmente la actividad biológica de IFN beta o IFN omega;
- (iv) inhibir la expresión superficial inducida por IFN de CD38 o MHC de clase I en células mononucleares de sangre periférica;
- (v) inhibir la expresión inducida por IFN de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica;
- (vi) inhibir el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma de lupus sistémico eritematoso (SLE);
- (vii) unirse a interferón alfa 2a humano con alta afinidad;
- (viii) unirse a interferón alfa 2b con alta afinidad.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse usando ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en este documento. Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo de unirse a IFN alfa puede determinarse usando ensayos de unión convencionales, tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA y/o Biacore). La capacidad del anticuerpo de inhibir diversas actividades funcionales de interferón alfa puede determinarse usando ensayos tales como los descritos en los ejemplos (por ejemplo, proliferación de células Daudi, expresión de marcadores celulares inducidos por IFN, expresión de IP-10 inducida por IFN, etc.).

En ciertas realizaciones de los procedimientos de diseño por ingeniería de anticuerpos de la invención, las mutaciones pueden introducirse aleatoria o selectivamente a lo largo de todo o parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-IFN alfa (por ejemplo, secuencia codificante de 13H5) y los anticuerpos anti-IFN alfa modificados resultantes pueden explorarse para la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en este documento. Los procedimientos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe procedimientos para crear y explorar mutaciones de anticuerpos usando

mutagénesis por saturación, ensamblaje por ligamiento sintético, o una combinación de los mismos. Como alternativa, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar y col. describe procedimientos para usar procedimientos de exploración computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

5 Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcial o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "convertido en sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, y col., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

15 Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe adicionalmente a continuación), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo creado por el hibridoma pueden obtenerse por amplificación convencional por PCR o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 13H5. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de 13H5, 13H7, y 7H9 se muestran en las SEC ID N° 25, 26, y 27, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_L de 13H5, 13H7, y 7H9 se muestran en las SEC ID N° 28, 29, y 30, respectivamente.

25 Una vez se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une de forma funcional a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido de forma funcional", como se usa en este contexto, pretende indicar que los dos fragmentos de ADN se unen de tal modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

35 El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo de forma funcional el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humana son conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación convencional por PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse de forma funcional a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

45 El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera Fab) uniendo de forma funcional el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CK. Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humana son conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación convencional por PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

55 Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen de forma convencional a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal modo que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse en forma de una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty y col., (1990) Nature 348:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden producirse por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas

de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en ratones es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. También son conocidos los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.

Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y modificarse por ingeniería para que contenga secuencias no murinas (por ejemplo, humanas) de inmunoglobulina usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567 de Cabilly y col.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una región flanqueante humana usando procedimientos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.225.539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.).

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IFN alfa pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones mencionados en este documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se mencionan colectivamente en este documento como "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias no reordenadas de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humana, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (véase por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran expresión reducida de IgM de ratón o κ , y en respuesta a inmunización, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humana experimentan cambios de clase y mutación somática para generar IgGK monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. y col. (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. y col. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. y col. (1993) *International Immunology* 5:641-656; Tuailon y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi y col. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. y col. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon y col. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. y col. (1994) *International Immunology* 6:579-591; y Fishwild, D. y col. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. Véanse adicionalmente, las patentes de Estados Unidos N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados Unidos N° 5.545.807 de Surani y col.; las publicaciones PCT N° WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT N° WO 01/14424 de Korman y col.

Los anticuerpos humanos pueden crearse usando un ratón que porte secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porte un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, mencionados en este documento como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida y col.

Más aún, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para crear anticuerpos anti-IFN alfa de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo mencionado como Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati y col.

Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para crear anticuerpos anti-IFN alfa de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, mencionados como "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka y col. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana (Kuroiwa y col. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y pueden usarse para crear anticuerpos anti-IFN alfa.

Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse usando procedimientos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos procedimientos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse por ejemplo: las patentes de Estados Unidos N° 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner y col.; las patentes de Estados Unidos N°

5.427.908 y 5.580.717 de Dower y col.; las patentes de Estados Unidos N° 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty y col.; y las patentes de Estados Unidos N° 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths y col.

- 5 Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson y col.

Inmunización de ratones de Ig humana

- 10 Cuando se usan ratones de Ig humana para crear anticuerpos humanos, dichos ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o recombinante de antígeno IFN alfa, como se describe por Lonberg, N. y col. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. y col. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851; y publicación PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada de IFN linfoblastoide (25-100 µg), preparada tratando una línea celular de linfoblastoide con virus de modo que la línea celular produzca una preparación de IFN alfa que contenga
15 múltiples subtipos de IFN alfa (pero no IFN omega) para inmunizar los ratones de Ig humana por vía intraperitoneal. Como alternativa, pueden usarse mezclas de formas recombinantes de subtipos de IFN alfa como inmunógeno.

- Los procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra IFN alfa se describen en el Ejemplo 1 a continuación. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en
20 adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, adyuvantes diferentes de los de Freund también se han hallado eficaces. Además, se ha descubierto que células completas en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede controlarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras plasmáticas que se obtienen de exanguinaciones retroorbitales. El plasma puede explorarse por ELISA
25 (como se describe a continuación), y pueden usarse ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IFN alfa para las fusiones. Los ratones pueden recibir un refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la retirada del bazo. Se espera que pueda necesitarse realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Típicamente se inmunizan entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Para ratones HuMab, habitualmente se usan las cepas tanto HCo7 como HCo12. Además, pueden producirse los transgenes tanto HCo7 como HCo12 juntos en un
30 único ratón que tiene dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12).

Como alternativa o adicionalmente, puede usarse la cepa de ratón KM, como se describe en el Ejemplo 2.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

- Para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales humanos, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglio linfático de ratones inmunizados y fusionase a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como
35 una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden explorarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a una sexta parte de la cantidad de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se siembran a aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero Clone fetal a 20%, medio condicionado "653" al 18%, origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM,
40 piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en que se reemplaza el HAT con HT. Los pocillos individuales después pueden explorarse por ELISA para anticuerpos monoclonales humanos IgM e
45 IgG. Una vez sucede el crecimiento extensivo del hibridoma, el medio puede observarse habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden volver a sembrarse en placa, explorarse de nuevo, y si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables después pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

- 50 Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces rotativos de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por DO280
55 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden distribuirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales

También pueden producirse anticuerpos en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una

combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección génica como es bien sabido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse los ADN que codifican las cadenas parciales o de longitud completa ligera y pesada, por técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de modo que los genes se unan de forma funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido de forma funcional" pretende indicar que el gen de anticuerpo está ligado en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función pretendida de regulación de la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores diferentes o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por procedimientos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico de anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en este documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del isotipo deseado de modo que el segmento V_H esté unido de forma funcional al segmento C_H dentro del vector y el segmento V_L esté unido de forma funcional al segmento C_L dentro del vector. Además o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido en fase al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los especialistas en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen elevados niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)) y polioma. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la β -globina. Aún más, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor $SR\alpha$, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas de tipo 1 (Takebe, Y. y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación en metotrexato) y el gen neo (para selección en G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se introducen por transfección en una célula huésped por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, o transfección con DEAE-dextrano. Aunque es teóricamente posible expresar anticuerpos en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferiblemente células huésped de mamífero, es lo más preferido porque dichas células eucariotas, y en particular células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha informado de que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar anticuerpos recombinantes incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad

Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS desvelado en el documento WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos convencionales de purificación de proteínas.

10 Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos pueden ensayarse para su unión a IFN alfa por, por ejemplo, ELISA convencional o por ensayos Biacore. En resumen, para ELISA, se recubren placas de microtitulación con IFN alfa (por ejemplo, la forma recombinante de diferentes subtipos de IFN alfa, o IFN de leucocitos o linfoblastoide) a 0,25 µg/ml en PBS, y después se bloquean con albúmina sérica bovina al 5% en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados con IFN alfa) a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal de cabra anti-IgG humana específico para Fc) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después de lavarlas, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a DO de 405-650. Preferiblemente, se usarán los ratones que desarrollan los mayores títulos para las fusiones.

20 También puede usarse un ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente para explorar hibridomas que muestran reactividad positiva con inmunógeno IFN alfa. Los hibridomas que se unen con elevada avidéz a IFN alfa se subclonan y caracterizan adicionalmente. Puede elegirse un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células precursoras (por ELISA), para preparar un banco de células en 5-10 viales almacenado a -140°C, y para la purificación de anticuerpos.

25 Para purificar anticuerpos anti-IFN alfa, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces rotativos de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por DO₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden distribuirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

35 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-IFN alfa seleccionados se unen a epítopes únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). Pueden realizarse estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados usando placas ELISA recubierta con IFN alfa como se ha descrito anteriormente. La unión del mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

40 Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISA de isotipo usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, los pocillos de las placas de microtitulación pueden recubrirse con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humano durante una noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 1%, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de los anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante una a dos horas. Los pocillos después pueden hacerse reaccionar con sondas conjugadas a fosfatasa alcalina específicas para IgG1 humana o IgM humana. Las placas se revelan y analizan como se ha descrito anteriormente.

45 Las IgG humanas anti-IFN alfa pueden ensayarse adicionalmente para la reactividad con antígeno IFN alfa por transferencia de Western. En resumen, pueden prepararse extractos celulares a partir de células que expresan IFN alfa y someterse a electroforesis en gel de poliácridamida con dodecil sulfato sódico. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternera fetal al 10%, y se sondan con los anticuerpos monoclonales a ensayar. La unión de IgG humana puede detectarse usando anticuerpo anti-IgG humana con fosfatasa alcalina y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Inmunconjugados

55 En otro aspecto, la presente invención caracteriza un anticuerpo anti-IFN alfa, o a fragmento del mismo, conjugado a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se mencionan en este documento como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se mencionan como "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, elimina) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina,

doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agente alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado calicheamicina anticuerpo está disponible en el mercado (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse a anticuerpos de la invención usando tecnología enlazadora disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptido. Puede elegirse un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible a escisión por bajo pH dentro del compartimento lisosomal o susceptible a escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tales como cathepsinas (por ejemplo, cathepsinas B, C, D).

Para un análisis adicional de los tipos de citotoxinas, enlazadores y procedimientos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. y col. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse a un isótopo radiactivo para generar agentes radiofarmacéuticos citotóxicos, también mencionados como radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopo radiactivos que pueden conjugarse a anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, aunque sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, ytrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. El procedimiento para preparar radioinmunoconjugados está establecido en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles en el mercado, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse procedimientos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y el resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxinas de pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidos, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-IFN alfa, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o partes de unión a antígeno del mismo, puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se una a al menos dos diferentes sitios de unión o moléculas diana. El anticuerpo de la invención puede, de hecho, derivatizarse o unirse a más de una molécula funcional diferente para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos diferentes sitios de unión y/o moléculas diana; se pretende que dichas moléculas multiespecíficas también estén abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" como se usa en este documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, puede unirse de forma funcional un anticuerpo de la invención (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que se

produzca una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por IFN alfa y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. El segundo epítipo diana puede ser un receptor Fc, por ejemplo, Fc γ RI humano (CD64) o un receptor Fc α humano (CD89). Por lo tanto, se describen en este documento moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc γ R, Fc α R o Fc ϵ R (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), como a células diana que expresan IFN alfa. Estas moléculas biespecíficas están dirigidas a células que expresan IFN alfa en células efectoras y desencadenan las actividades de célula efectora mediadas por el receptor Fc, tales como fagocitosis de una célula que expresa IFN alfa, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC), liberación de citoquinas, o generación de anión superóxido.

También se describe un aspecto en que la molécula biespecífica es multiespecífica, donde la molécula puede incluir adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-IFN alfa. La tercera especificidad de unión puede ser una parte anti-factor de potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína superficial implicada en la actividad citotóxica y mediante la cual aumenta la respuesta inmune contra la célula diana. La "parte anti-factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y mediante el cual se produce una potenciación del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o antígeno celular diana. La "parte anti-factor de potenciación" puede unirse a un receptor Fc o un antígeno de célula diana. Como alternativa, la parte anti-factor de potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la parte anti-factor de potenciación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que provoca una respuesta inmune aumentada contra la célula diana).

Las moléculas biespecíficas descritas en este documento pueden comprender como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner y col. patente de Estados Unidos N° 4.946.778.

La especificidad de unión por un receptor Fc γ puede proporcionarse por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en este documento, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadenas γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o soluble que están agrupadas en tres clases de receptor Fc γ receptor: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). El receptor Fc γ puede ser un Fc γ RI humano de alta afinidad. El Fc γ RI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra elevada afinidad por IgG monomérica (10^8 - 10^9 M⁻¹).

La producción y caracterización ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc γ preferidos se describen por Fanger y col. en la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de Estados Unidos N° 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fc γ del receptor y, por tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-Fc γ RI específicos son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible en la American Type Culture Collection, número de acceso de la ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor Fc γ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F y col. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y la publicación PCT WO 94/10332. La línea celular que produce el anticuerpo H22 se depositó en la American Type Culture Collection con la denominación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

La especificidad de unión por un receptor Fc puede proporcionarse por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), cuya unión está preferiblemente no bloqueada por inmunoglobulina A (IgA) humana. La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen α (Fc α RI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas de corte y ajuste alternativo de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones celulares no efectoras. Fc α RI tiene afinidad media ($\approx 5 \times 10^7$ M⁻¹) tanto por IgA1 como por IgA2, que aumenta tras la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. y col. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos para Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc α RI fuera del dominio de unión a ligando IgA (Monteiro, R.C. y col. (1992) J Immunol. 148:1764).

Fc α RI y Fc γ RI son receptores desencadenantes preferidos para su uso en las moléculas biespecíficas de la invención porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median la presentación potenciada de

antígeno de antígenos, incluyendo auto-antígenos, dirigidos a los mismos.

Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-IFN alfa, usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse con otra. Cuando la especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede usarse una diversidad de agentes de acoplamiento o ligamiento cruzado para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de ligamiento cruzado incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky y col. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros procedimientos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. N° 78, 118-132; Brennan y col. (1985) Science 229:81-83), y Glennie y col. (1987) J Immunol. 139: 2367-2375). Agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante enlaces sulfhidrilo de las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de restos sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden estar codificadas en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este procedimiento es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Se describen procedimientos para preparar moléculas biespecíficas por ejemplo en la patente de Estados Unidos número 5.260.203; la patente de Estados Unidos número 5.455.030; la patente de Estados Unidos número 4.881.175; la patente de Estados Unidos número 5.132.405; la patente de Estados Unidos número 5.091.513; la patente de Estados Unidos número 5.476.786; patente de Estados Unidos número 5.013.653; la patente de Estados Unidos número 5.258.498; y la patente de Estados Unidos número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse por, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia de Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse usando por ejemplo, un anticuerpo ligado a enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autorradiografía.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o parte o partes de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-IFN alfa de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-IFN alfa (por ejemplo, un agente inmunosupresor).

Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agente isotónicos y retardadores de la absorción que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, medular o epidérmica (por ejemplo, por inyección

o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

5 Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico y fosforoso, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como
10 ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-sustituídos, ácidos hidroxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácido sulfónicos alifáticos y aromáticos. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalino-térreos, tales como sodio, potasio, magnesio y calcio, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina y procaina.

15 Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico y sulfito sódico; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo y alfa-tocoferol; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y fosfórico.

20 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de
25 dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agente emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, *supra*, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol y ácido fenol sódico. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares o cloruro sódico en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma
30 farmacéutica inyectable puede conseguirse por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

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

40 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso
45 de una dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

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

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma monodosis variará dependiendo del sujeto que se esté tratando, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma monodosis

generalmente será esa cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un ciento por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, mucho más preferiblemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma monodosis para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma monodosis, como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculadas para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas monodosis de la invención están dictaminadas por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-IFN alfa de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, dándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo habitualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales puede ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo contra el antígeno diana en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración plasmática de anticuerpo de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos procedimientos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse en forma de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semi-vida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestra la semi-vida más larga, seguidos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente elevada a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o detiene el progreso de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticas incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-IFN alfa de la invención preferiblemente provoca una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención de la deficiencia o discapacidad debidos a la patología. Por ejemplo, en el caso de lupus sistémico eritematoso (SLE), una dosis terapéuticamente eficaz preferiblemente evita el deterioro adicional de los síntomas físicos asociados con SLE, tales como, por ejemplo, dolor o fatiga. Una dosis terapéuticamente eficaz preferiblemente también previene o retarda la aparición de SLE, tal como puede

desearse cuando están presentes signos tempranos o preliminares de la enfermedad. Asimismo, incluye el retardo de la progresión crónica asociada con SLE. Los ensayos de laboratorio utilizados en el diagnóstico de SLE incluyen bioquímica (incluyendo la medición de los niveles de IFN alfa), hematología, serología y radiología. Por consiguiente, puede usarse cualquier ensayo clínico o bioquímico que controle cualquiera de los anteriores para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente eficaz para tratar SLE. Un especialista en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionadas.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciarán los especialistas en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías preferidas de administración para anticuerpos de la invención incluyen vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, modular u otras vías parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en este documento significa modos de administración diferentes de administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular, epidural e intraesternal.

Como alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía tópica, epidérmica o a la mucosa de administración, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos divulgados en las patentes de Estados Unidos N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes o módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispersar medicación a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos N° 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos N° 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad precisa de infusión; la patente de Estados Unidos N° 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; la patente de Estados Unidos N° 4.439.196, que divulga un sistema de suministro osmótico de fármacos que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que divulga un sistema de suministro osmótico de fármacos. Son conocidos muchos otros de estos implantes, sistemas de suministro, y módulos para los especialistas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hemato-encefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, por tanto potencian el suministro dirigido de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los restos ejemplares de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe y col. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos y procedimientos de la invención

Los anticuerpos monoclonales anti-IFN alfa y derivados/conjugados relacionados y composiciones de la presente invención tienen una diversidad de utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la proteína IFN alfa, *in vitro* o *in vivo*, usando ensayos convencionales de unión anticuerpo/antígeno (por ejemplo, ELISA, RIA). Además, estas moléculas pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de trastornos en que IFN alfa desempeña una

tarea. Como se usa en este documento, el término "sujeto" pretende incluir tanto seres humanos como animales no humanos. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que muestran trastornos autoinmunes. La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, reptiles, etc.

- 5 Las composiciones de anticuerpo de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple (MS), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD; incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca), diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide (RA) y glomerulonefritis. Además, las composiciones de anticuerpo de la invención pueden usarse para inhibir o prevenir el rechazo de transplantes o en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

- 10 Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse inicialmente para la actividad de unión asociada con el uso terapéutico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse usando Biacore, ELISA y ensayos citométricos de flujo descritos en los Ejemplos a continuación. Además, la actividad de estas moléculas puede ensayarse, por ejemplo, por un ensayo de proliferación celular después de exposición a IFN alfa, como se describe en los Ejemplos a continuación. Los procedimientos adecuados para administrar anticuerpos y composiciones de la presente invención son bien conocidos en la técnica, y se han descrito adicionalmente anteriormente. Las dosificaciones adecuadas también pueden determinarse dentro de las habilidades de la técnica y dependerán de la edad y peso del sujeto y el fármaco particular usado. Las dosificaciones ejemplares se han descrito adicionalmente anteriormente.

- 15 Los anticuerpos anti-IFN alfa de la invención también pueden co-administrarse con otros agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente.

- 20 Como se ha indicado anteriormente, para propósitos de terapia, se administran una composición de anticuerpo humano y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una composición de anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es "fisiológicamente significativo" si su presencia provoca un cambio detectable en la fisiología de un paciente destinatario. Un agente terapéutico dirigido es "terapéuticamente eficaz" si suministra una proporción mayor de la dosis administrada a la diana pretendida que la que se acumula en la diana después de administración sistémica del agente equivalente no dirigido.

- 25 En este documento también se divulgan kits que comprende las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la invención e instrucciones de uso. El kit puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional, tal como uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que inhibe la actividad IFN alfa pero que es distinto del primer anticuerpo humano).

- 30 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben entenderse como una limitación adicional.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra IFN alfa

Antígeno:

- 40 Se usó IFN α humano natural que contenían múltiples subtipos purificado a partir de una línea celular linfoblastoide humana estimulada viralmente, que provocó la producción de múltiples subtipos de IFN alfa pero no IFN omega como antígeno.

Ratones KMTM transgénicos transcromosómicos:

- 45 Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos contra IFN alfa usando la cepa KM de ratones transgénicos transcromosómicos, que expresa genes de anticuerpo humano. En esta cepa de ratón, el gen endógeno de cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en Chen y col. (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen endógeno de cadena pesada de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187 para ratones HuMab. El ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild y col. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. El ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana, SC20, como se describe en la publicación PCT WO 02/43478.

Inmunizaciones de ratón KMTM:

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra IFN alfa, se inmunizaron ratones KMTM con IFN α humano natural que contenían múltiples subtipos purificado a partir de una línea celular linfoblastoide humana

estimulada viralmente. Los esquemas de inmunización general se describen en Lonberg, N. y col. (1994) Nature 368: 856-859; Fishwild, D. y col. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones eran de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación natural purificada (25-100 µg) de antígeno IFN alfa (es decir, purificado de células linfoblastoides estimuladas viralmente) para inmunizar los ratones KMTM por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (Sc).

Los ratones transgénicos transcromosómicos se inmunizaron por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (Sc) con antígeno en adyuvante completo de Freund dos veces, seguido de 2-4 semanas de inmunización IP (hasta un total de 8 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmune se controló por exanguinaciones retroorbitales. El plasma se exploró por ELISA (como se describe a continuación), y los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-IFN α se usaron para las fusiones. Los ratones recibieron un refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y la retirada del bazo.

Selección de ratones KMTM que producen anticuerpo anti-IFN α :

Para seleccionar ratones KMTM que produzcan anticuerpos se usó a IFN α , se ensayaron los sueros de ratones inmunizados por ELISA como se describe por Fishwild, D. y col. (1996). En resumen, se recubrieron placas de microtitulación con IFN α natural purificado de células linfoblastoides a 1-2 µg/ml en PBS, 50 µl/pocillo, se incubaron a 4°C durante una noche, después se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con IFN α a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgG humana conjugado con peroxidada de rábano rusticano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavarlas, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se determinó la densidad óptica para cada pocillo usando un espectrofotómetro ajustado a 415 nm de longitud de onda con una corrección de fondo a 495 nm. Los ratones que desarrollaron los mayores títulos de anticuerpos anti-IFN α se usaron para las fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe a continuación y los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron para la actividad anti-IFN α por ELISA.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra IFN α :

Se aislaron esplenocitos de ratones KMTM y se fusionaron a una línea celular de mieloma de ratón en base a protocolos convencionales usando PEG. Los hibridomas resultantes después se exploraron para la producción de anticuerpos específicos de antígeno.

Se fusionaron suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con una cuarta parte de la cantidad de células de mieloma de ratón no secretor P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) o células de mieloma de ratón no secretor SP2/0 (ATCC, CRL 1581) usando PEG al 50% (Sigma). Las células se sembraron a una densidad de aproximadamente 1x10⁵/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano y se incubaron aproximadamente 2 semanas en medio selectivo que contenía suero bovino fetal al 10%, P388D1 al 10% (ATCC, CRL TIB-63), medio condicionado origen al 3-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con elevado contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato sódico) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio en que se había reemplazado el HAT con HT. Los pocillos individuales después se exploraron por ELISA (descrito anteriormente) para anticuerpos IgG humanos anti-IFN α .

El medio condicionado de los hibridomas secretores de anticuerpo identificados por ELISA se ensayó en un ensayo de proliferación de Daudi (descrito a continuación) para la capacidad de bloquear los efectos anti-proliferativos de IFN α . Los hibridomas con la mayor actividad neutralizante en la exploración del ensayo de Daudi se subclonaron al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables resultantes después se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo monoclonal en medio de cultivo tisular. La exploración del ensayo de proliferación de Daudi se repitió para confirmar la actividad de los subclones. Los subclones con la mayor actividad en el ensayo de Daudi se aumentaron en escala para producir suficiente medio condicionado (típicamente 1 l) para la purificación de anticuerpo monoclonal anti-IFN α para caracterización adicional.

Exploración de hibridomas para anticuerpo anti-IFN α neutralizante: ensayo de proliferación de Daudi:

El interferón alfa inhibe la proliferación de células Daudi (linfoma de Burkitt, ATCC n° CCL-213) de un modo dependiente de dosis. Un anticuerpo neutralizante, que bloquee la unión del interferón a su receptor, restaurará la proliferación. Se determinaron curvas de respuesta a dosis para los efectos anti-proliferativos de IFN α linfoblastoide natural en Daudi y se calculó una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de Daudi en un 50% (CE50).

El medio condicionado de hibridoma se mezcló con células Daudi en medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, 1x 2-ME, L-glutamina y penicilina estreptomycin) con y sin la adición de IFN α en una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos. La mezcla final de reactivos fue la siguiente: 1 x10⁴ células Daudi + sobrenadante de hibridoma al 10% +/- IFN α a CE50 por 100 µl/pocillo. Las células se incubaron a 37°C, CO₂ al 5%, 72 h. La proliferación se ensayó con la adición de MTS (Promega), 20 µl/pocillo y la D.O. a 490 nm se leyó después de 3 horas adicionales de incubación. La cantidad de células viables era proporcional a la lectura de D.O. El

porcentaje de inhibición de Daudi se calculó para el sobrenadante de hibridoma + IFN α relativo al sobrenadante de hibridoma solo y en comparación con un control de medio con y sin IFN α . Los hibridomas se ordenaron por categoría de acuerdo con la potencia del bloqueo de IFN α y se seleccionaron los hibridomas neutralizantes más activos para subclonación.

- 5 Se seleccionaron los clones de hibridoma 13H5, 13H7 y 7H9 para ensayos adicionales.

Ejemplo 2: Caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales humanos 13H5, 13H7 y 7H9

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 13H5, 13H7, y 7H9 se obtuvieron de los hibridomas 13H5, 13H7, y 7H9, respectivamente, usando técnicas convencionales de PCR y se secuenciaron usando técnicas convencionales de secuenciación de ADN.

- 10 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13H5 se muestran en la Figura 1A y en las SEC ID N° 25 y 19, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 13H5 se muestran en la Figura 1B y en las SEC ID N° 28 y 22, respectivamente.

- 15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 13H5 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 13H5 utiliza un segmento V_H de VH 1-18 de la línea germinal, un segmento D indeterminado, y un segmento J_H de J_H 4b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia 13H5 V_H con la secuencia VH 1-18 de la línea germinal se muestra en la Figura 4. Análisis adicionales de la secuencia 13H5 V_H usando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 1A y 4, y en las SEC ID N° 1, 4 y 7, respectivamente.
- 20

- 25 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 13H5 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 13H5 utiliza un segmento V_L de VK A27 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia 13H5 V_L con la secuencia VK A27 de la línea germinal se muestra en la Figura 6. Análisis adicionales de la secuencia 13H5 V_L usando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR3 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 1B y 6, y en las SEC ID N° 10, 13 y 16, respectivamente.
- 30

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13H7 se muestran en la Figura 2A y en las SEC ID N° 26 y 20, respectivamente.

- 30 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 13H7 se muestran en la en Figura 2B y en las SEC ID N° 29 y 23, respectivamente.

- 35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 13H7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 13H7 utiliza un segmento V_H de VH 4-61 de la línea germinal humana, un segmento D de 3-10 de la línea germinal humana, y un segmento J_H de J_H 4b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia 13H7 V_H con la secuencia VH 4-61 de la línea germinal se muestra en la Figura 5. Análisis adicionales de la secuencia 13H7 V_H usando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 2A y 5, y en las SEC ID N° 2, 5 y 8, respectivamente.

- 40 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 13H7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 13H7 utiliza un segmento V_L de VK A27 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK 2 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia 13H7 V_L con la secuencia VK A27 de la línea germinal se muestra en la Figura 6. Análisis adicionales de la secuencia 13H7 V_L usando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 2B y 6, y en las SEC ID N° 11, 14 y 17, respectivamente.
- 45

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7H9 se muestran en la Figura 3A y en las SEC ID N° 27 y 21, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7H9 se muestran en la Figura 3B y en las SEC ID N° 30 y 24, respectivamente.

- 50 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 7H9 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 7H9 utiliza un segmento V_H de VH 1-18 de la línea germinal humana, un segmento D de 6-6 de la línea germinal humana, y un segmento J_H de J_H 4b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia 7H9 V_H con la secuencia VH 1-18 de la línea germinal se muestra en la Figura 4. Análisis adicionales de la secuencia 7H9 V_H usando el sistema de

Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 3A y 4, y en las SEC ID N° 3, 6 y 9, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 7H9 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 7H9 utiliza un segmento V_L de VK A27 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia 7H9 V_L con la secuencia VK A27 de la línea germinal se muestra en la Figura 6. Análisis adicionales de la secuencia 7H9 V_L usando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 3B y 6, y en las SEC ID N° 12,15 y 18, respectivamente.

Ejemplo 3: Anticuerpos monoclonales humanos anti-IFN alfa inhiben la actividad biológica de múltiples subtipos de interferón alfa

Como se ha descrito en el Ejemplo 1, el interferón alfa inhibe la proliferación de células Daudi (linfoma de Burkitt, ATCC n° CCL-213) de un modo dependiente de la dosis. Un anticuerpo neutralizante, que bloquee la unión del interferón a su receptor, restaurará la proliferación. Usando este ensayo de proliferación celular, se examinó la especificidad de los anticuerpos humanos anti-IFN alfa purificados ensayando el bloqueo de IFN α linfoblastoide natural, interferón de leucocitos natural, 13 subtipos de IFN alfa recombinante, IFN beta e IFN omega.

Se cultivaron células Daudi en medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, 1x 2-ME, L-glutamina y penicilina estreptomycin) con y sin la adición de IFN α en una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos. Cada interferón de tipo I ensayado se ensayó a CE₅₀ y se mezcló con una titulación en serie de factor 2 de cada anticuerpo, típicamente de 50 ug/ml (312 nM) a 381 pg/ml (2,4 pM). La mezcla anticuerpo/IFN se añadió a células Daudi en una placa de fondo de 96 pocillo a una densidad final de 1×10^4 células Daudi/100 ul/pocillo y se incubó a 37°C, CO₂ al 5%, 72 h. La proliferación se ensayó con la adición de MTS (Promega), 20 ul/pocillo, y se midió la D.O. a 490 nm después de una incubación adicional de 3 horas. La cantidad de células viables era proporcional a la lectura de D.O. El porcentaje de bloqueo de interferón se calculó relativo a la proliferación de las células Daudi en ausencia de IFN (=bloqueo del 100%) y en presencia de IFN solo (=bloqueo del 0%). Los anticuerpos se valoraron de acuerdo con el grado de bloqueo, produciendo un perfil de la especificidad de subtipo de IFN α para cada anticuerpo ensayado. Se obtuvo una CE₅₀ con el software PRISM™ usando regresión no lineal; respuesta sigmoidea a dosis; ajuste a curva de pendiente variable. Los resultados demostraron que el anticuerpo humano anti-IFN alfa 13H5 inhibe la acción de múltiples subtipos de interferón alfa, particularmente, IFN α 6, 2b, 2a, 1, 16, 10, 8, 5 y 14, pero no IFN α 21, IFN β o IFN ω . 13H5 es un inhibidor de bajo nivel de los subtipos de IFN alfa 17, 7 y 4. Los valores de CE₅₀ y el % de bloqueo de interferón se muestran en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Inhibición del anticuerpo de múltiples subtipos de IFN alfa

Bloqueo de IFN de 13H5		
IFN	CE50	1000x
IFN linfoblastoide	127 pM	82%
IFN α 6	208 pM	95%
IFN α 2b	432 pM	80%
IFN α 2a	448 pM	95%
IFN α 1	4,6 nM	68%
IFN de leucocitos	5,5 nM	70%
IFN α 16	6,8 nM	80%
IFN α 10	19,6 nM	40%
IFN α 8	26 nM	37%
IFN α 5	56 nM	47%
IFN α 14	70 nM	34%
IFN α 17	110 nM	13%
IFN α 7	>300 nM	15%
IFN α 4	>300 nM	7%
IFN α 21	>300 nM	NS
IFN-beta	>300nM	NS
IFN-omega	>300 nM	NS
NS = no significativo		

Ejemplo 4: Inhibición de la inducción por IFN alfa de marcadores de superficie celular por anticuerpos anti-IFN alfa

Se sabe que la adición de IFN alfa 2b a medios de cultivo celular induce la expresión de los marcadores de superficie celular CD38 y MHC de clase I sobre células mononucleares de sangre periférica normal (PBMNC). Se ensayó la actividad del anticuerpo humano anti-IFN alfa 13H5 para la inhibición de la expresión inducida por interferón de marcadores de superficie celular sobre cultivos de células humanas primarias y se ensayó por análisis FACS.

El anticuerpo monoclonal anti-IFN α 13H5 y los controles de isotipo se diluyeron a 20 ug/ml cada uno en medio de cultivo PBMNC (RPMI 1640 + FBS al 10% + suero humano al 1%). El anticuerpo se dispensó a 1,5 ml/pocillo en matraces de cultivo con tapón ventilado T25 y se mezcló con un volumen igual de 400 u/ml de IFN de leucocitos, IFN alfa 2b o IFN ω , diluido en medio de cultivo o con medio solo. Las PBMNC se aislaron de sangre periférica humana normal usando tubos Vacutainer® CPT™ recubierto con heparina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Becton Dickinson & Co). Las células se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI 1640 + FBS al 10% + suero humano al 1%) a 2×10^6 células/ml y se añadieron en un volumen igual a las mezclas Ab/IFN de modo que el ensayo final contuviera: 6×10^6 PBMNC + 5 ug/ml Ab +/- 100 u/ml IFN por 6 ml medio. Los matraces se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 o 48 h.

Se recogió el medio condicionado de cada matraz y se recuperaron las células en suspensión por centrifugación a 1000 rpm en un rotor Sorvall RTH-750. Las células sedimentadas se retuvieron en hielo y el sobrenadante se congeló a -80°C para ELISA. Las células adherentes se recuperaron del matraz con un lavado en PBS (2 ml), seguido de 15 minutos de incubación en versene (3 ml). El matraz se raspó al final de la incubación en versene y finalmente el matraz se aclaró con lavado en PBS (2 ml). Cada uno de los lavados en PBS y versene se combinó con las células recuperadas de la recogida de medio de condicionado. La suspensión celular combinada se centrifugó a 1000 rpm en un rotor Sorvall RTH-750, el sedimento resultante se resuspendió a 300 ul en tampón de tinción (PBS + EDTA 0,1 M + FBS al 2% + HS al 1%) y se dispensó a 100 ul/pocillo en un placa de 96 pocillos de fondo en V. La placa se centrifugó por pulsos a 2800 rpm en un rotor Sorvall RTH-750 y las células sedimentadas se resuspendieron a 25 μ l/pocillo en anticuerpos marcados con fluorocromo del siguiente modo: (1) anti-MHC I-FITC de ratón + anti-CD38-PE de ratón, y (2) controles de isotipo, IgG-FITC de ratón + IgG-PE de ratón. La placa se incubó en hielo durante 45 minutos, protegida de la luz. Las células se lavaron tres veces con la adición de 200 ul de tampón de tinción seguido de centrifugación por pulsos y finalmente se resuspendió en 200 μ l de paraformaldehído al 2% en PBS. La tinción de células monocitos se analizó por citometría de flujo con el Becton Dickinson FACScalibur™, los pasos se representaron en el gráfico de dispersión directa frente a dispersión lateral para retirar las células contaminantes del análisis. Los resultados demostraron que el anticuerpo monoclonal humano 13H5 inhibe IFN de leucocitos y los cambios inducidos por IFN α 2b recombinante en la expresión de CD38 y MHC de clase I sobre PBMNC normales. El anticuerpo monoclonal humano 13H5 no bloquea los cambios mediados por IFN ω en la expresión de marcadores de superficie celular de CD38 y MHC de clase I. Estos resultados se muestran en las Tablas 2 y 3 a continuación.

Tabla 2: Porcentaje de cambio en la expresión inducida por IFN de MHC de clase I sobre PBMNC normales

Tratamiento de Ab	IFN de leucocitos (100 u/ml)	IFN alfa 2b (100 u/ml)	IFN omega (100 u/ml)
Sin anticuerpo	31	21	28
13H5 (5 μ g/ml)	-1	-1	29
Ig de control (5 μ g/ml)	16	25	26

Tabla 3: Porcentaje de cambio en la expresión inducida por IFN de CD38 sobre PBMNC normales

Tratamiento de Ab	IFN de leucocitos (100 u/ml)	IFN alfa 2b (100 u/ml)	IFN omega (100 u/ml)
Sin anticuerpo	774	426	782
13H5 (5 μ g/ml)	195	16	760
Ig de control (5 μ g/ml)	614	392	829

Ejemplo 5: Inhibición de la expresión inducida por IFN de IP-10 por anticuerpos anti-IFN alfa

Se sabe que la adición de IFN alfa 2b a medios de cultivo celular induce la expresión de IP-10 en células mononucleares de sangre periférica normal (PBMNC). Se ensayó la actividad del anticuerpo humano anti-IFN alfa 13H5 para la inhibición de la expresión inducida por interferón de IP-10 en cultivos de PBMNC normales por ensayo de unión ELISA.

Se preparó un cultivo de PBMNC como se ha descrito en el Ejemplo 4, se condicionó con IFN de leucocitos, IFN alfa 2b, o IFN ω . El medio condicionado se analizó para la expresión de IP-10/CXCL10 usando un kit ELISA tipo sándwich cuantitativo (Quantikine®, R&D Systems) a una dilución 1:30 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal humano 13H5 inhibe la expresión inducida por IFN de leucocitos e IFN α 2b recombinante de IP-10 en cultivo de PBMNC normales pero no bloque la expresión inducida por IFN ω de IP-10. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Inhibición por anticuerpo de la expresión inducida por IFN de IP-10 en PBMNC normales

Tratamiento de Ab	Sin IFN	IFN de leucocitos (100 u/ml)	IFN alfa 2b (100 u/ml)	IFN omega (100 u/ml)
Sin anticuerpo	907	2665	2739	2904
13H5 (5 μ g/ml)	946	1765	1262	3862
Ig de control (5 μ g/ml)	838	3512	3117	3960

Ejemplo 6: Caracterización de afinidad del anticuerpo monoclonal humano anti-IFN alfa

En este ejemplo, se examinó el anticuerpo monoclonal 13H5 para la afinidad de unión examinada de IFN alfa 2a recombinante e IFN alfa 2b usando análisis Biacore.

Se capturaron anticuerpos purificados a 10 μ g/ml, en un chip CM5 recubierto con Prot-G. Las concentraciones de antígeno de 80 nM a 10 nM en tapón de procesamiento HBS-EP se pasaron sobre el chip a una velocidad de 25 μ l/min. El tiempo de asociación permitido fue de 5 minutos, seguido de un periodo de disociación de 10 minutos. Se eliminó la unión de fondo y la no específica de antígeno tanto al chip como a los anticuerpos detectando la unión a la superficie con Ig humana de control de isotipo (Sigma) y tampón capturados. La regeneración del chip se consiguió con un caudal de 100 μ l/min durante 0,4 minutos usando NaOH 20 mM + NaCl 400 mM. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir usando el software BIAevaluation (Biacore AB). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5: Características de unión del anticuerpo monoclonal 13H5

Subtipo de IFN alfa	K_D	K_{on}	K_{off}
IFN alfa 2a	$1,0 \times 10^{-10}$ M	$3,3 \times 10^{-5}$ 1/Ms	$3,5 \times 10^{-5}$ 1/Ms
IFN alfa 2b	$1,0 \times 10^{-10}$ M	$5,1 \times 10^{-5}$ 1/Ms	$5,3 \times 10^{-5}$ 1/Ms

Ejemplo 7: Inhibición del anticuerpo del desarrollo mediado por plasma SLE de células dendríticas

El plasma SLE induce el desarrollo de células dendríticas a partir de monocitos humanos normales. En este ejemplo, se ensayaron anticuerpos monoclonales humanos anti-IFN alfa purificados para la inhibición del desarrollo de células dendríticas, evaluada por la capacidad de los anticuerpos de inhibir la inducción de los marcadores de superficie celular CD38, MHC de clase I y CD123 por plasma SLE.

Se diluyó una placa leuco-plaquetaria de 25 ml cuatro veces con PBS. La muestra se separó en 4 tubos cónicos de 50 ml, y se estratificaron 15 ml de medio de separación de linfocitos (ICN Biomedicals) por debajo. Después de una centrifugación de 30 minutos a 500 x g, la capa leuco-plaquetaria que contenía las PBMC se retiró y se lavó con PBS. Las células se resuspendieron en medio de cultivo a 4×10^6 células/ml. Los monocitos se aislaron incubando las PBMC ($2,0 \times 10^7$ células/5 ml/matraz de 25 cm^2) durante 1,5 h a 37°C en medio de cultivo y después se retiraron por lavado las células no adherentes dos veces. Después del segundo lavado, las células se cultivaron en medio que contenía suero humano inactivado por calor al 1%. Se añadió plasma de paciente SLE al veinticinco por ciento más/menos anticuerpos neutralizantes y controles de isotipo (30 μ g/ml) a los matraces de cultivo; se usó IFN alfa 2b (100 y 10 μ l/ml) más plasma humano normal al 25% como control positivo para la inducción marcadora. Los matraces se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante tres a siete días. Después se recuperaron las células dendríticas del medio condicionado, con PBS y tratamiento con versene si fuera necesario, antes de la tinción como se describe para el bloqueo de la inducción marcadora en cultivo de PBMNC (como se ha descrito en el Ejemplo 4 anteriormente). La tinción de las células dendríticas se analizó por citometría de flujo con el Becton Dickinson FACScalibur™. Los pasos se representaron en el gráfico de dispersión directa frente a dispersión lateral para retirar las células contaminantes del análisis. El anticuerpo monoclonal humano anti-IFN alfa 13H5 inhibe el proceso dependiente de IFN alfa del desarrollo de células dendríticas, como se demuestra por la expresión normalizada de los marcadores de superficie celular MHC de clase I, CD38, y CD123 en presencia de 13H5. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 6, en la que (A), (B), (C) y (D) resumen los resultados para cuatro muestras donantes de SLE representativas.

Tabla 6: Inhibición de la maduración de células dendríticas

		Plasma donante 40 (13 ui/ml IFN)					Plasma donante 39 (19 ui/ml IFN)		
(A)	Cond. cultivo	MHC I	CD123	CD38	(B)	Cond. cultivo	MHC I	CD123	CD38
	0 IFN	148,34	14,22	39,78		0 IFN	248,83	18,63	32,69
	10 ui/ml IFN α 2b	199,84	18,92	44,18		10 ui/ml IFN α 2b	331,82	21,42	63,23
	100 ui/ml IFN α 2b	229,05	26,27	63,36		100 ui/ml IFN α 2b	430,87	30,56	60,61
	0 Ab	206,02	22	46,78		0 Ab	443,21	17,53	44,87
	13H5	144,92	13,67	35,11		13H5	330,59	14,18	20,56
	IgG de control	193,52	21,5	62,04		IgG de control	432,43	17,88	39,33

		Plasma donante 36					Plasma donante 59 (75 ui/ml IFN)		
(C)	Cond. cultivo	MHC I	CD123	CD38	(D)	Cond. cultivo	MHC I	CD123	CD38
	0 IFN	358,88	15,25	45,75		0 IFN	228,96	10,5	58
	10 ui/ml IFN α 2b	457,133	17,41	58,48		10 ui/ml IFN α 2b	271,19	11,95	86,49
	100 ui/ml IFN α 2b	496,32	20,63	64,55		100 ui/ml IFN α 2b	293,99	12,73	112,49
	0 Ab	488,58	28,92	88,31		0 Ab	202,04	14,74	61,61
	13H5	429,31	15,44	73,88		13H5	127,22	9,17	30,79
	IgG de control	485,7	19,75	115,18		IgG de control	266	14,4	55,46

Ejemplo 8: Mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal 13H5

En este ejemplo, se realizaron varios experimentos de unión usando citoquina y anticuerpo radiomarcados con células que expresan IFNAR para determinar el mecanismo de acción para 13H5.

En la primera serie de experimentos, se radioyodó IFN α 2a recombinante con una actividad específica de 29,3 Ci/mmol (tubos Pierce IODO-GEN®) y se determinó que se unía específicamente a células Daudi con una K_D de aproximadamente 1 nM. Para examinar la unión competitiva de este ligando a las células, se bloquearon las placas de fibra de vidrio con 200 μ l/pocillo de tampón de leche durante una noche a 4°C. Las células Daudi se dispensaron a 2×10^6 células/pocillo en medio RPMI 1640 y se mezclaron con 125 I-IFN α (2 nM), más una dilución en serie de factor 3 de competidor, 13H5, un anticuerpo de control isotipo o IFN α no marcado (30 nM a 14 pM). La placa se incubó 2 horas a 4°C en un agitador antes de lavarse con RPMI y secarse al aire. Los filtros se transfirieron a tubos de vidrio y se analizaron para la radiactividad.

Los resultados representativos de varios experimentos se muestran en la Figura 7. Se usó no marcado como control positivo y se observó que bloqueaba específicamente la unión de 125 I-IFN α con una CI_{50} de aproximadamente 0,5 nM. El anticuerpo 13H5, sin embargo, no bloqueó la unión de ligando yodado pero en su lugar se observó que potenciaba la señal radiactiva asociada con las células tratadas, lo que contrasta con el comportamiento del anticuerpo de control de isotipo, que no tuvo efecto sobre la unión a 125 I-IFN α a las células. Este resultado indica que 13H5 tiene un mecanismo no competitivo de acción y neutraliza la actividad biológica por bloqueo de la señalización pero no por bloqueo de la unión del ligando.

El resultado anterior también sugirió que 13H5 puede llegar a asociarse con la superficie celular en presencia de IFN α . Como cada molécula 13H5 tiene la capacidad de unirse a dos moléculas IFN α , es posible que estos acontecimientos provocaran también que un segundo ligando se uniera a la membrana celular. Esta hipótesis está apoyada por la observación de que la radiactividad asociada con las células estaba potenciada en aproximadamente 2 veces a concentraciones de anticuerpo y ligando coherentes con una proporción 1:1 de IFN α a sitios de unión de 13H5.

Para examinar adicionalmente el mecanismo de acción de 13H5, se ensayó la unión del anticuerpo a células Daudi usando anticuerpo radiomarcado en presencia o ausencia de IFN α 2a. La citoquina se usó a una concentración (10 nM) calculada para saturar la unión de IFNAR en base a estudios previos de unión. El anticuerpo 13H5 se radioyodó con una actividad específica de 414 Ci/mmol (tubos Pierce IODO-GEN®). Para examinar la unión del anticuerpo a las células, se bloquearon las placas de fibra de vidrio con 200 μ l/pocillo de tampón de leche durante una noche a 4°C. Las células Daudi se dispensaron a 2×10^6 células/pocillo en medio RPMI 1640 y se mezclaron con una dilución en serie de factor 2 de 125 I-13H5 (20 nM a 20 pM), más/menos IFN α 2a (10 nM). La placa se incubó 2 horas a 4°C en un agitador antes de lavarse con RPMI y secarse al aire. Los filtros se transfirieron a tubos de vidrio y se

analizaron para la radiactividad. Los valores de CPM medidos para la unión de 125 -13H5 solo se sustrajeron de los medidos en presencia de IFN α 2a para determinar la unión dependiente de IFN α 2a. Los resultados representativos de varios experimentos se muestran en la Figura 8. Los resultados mostraron una unión saturable dependiente de la dosis de 125 -13H5 a células Daudi en presencia de IFN α 2a pero una unión insignificante con 125 -13H5 solo. La unión específica dependiente de IFN α de 13H5 está representada en la Figura 8 por círculo y se calculó sustrayendo las CPM para el anticuerpo solo (que representa la unión no específica) del total de CPM para la unión de 13H5 en presencia de IFN α .

Por tanto, en resumen, el mecanismo de acción de 13H5 es uno no competitivo en que el complejo de IFN α unido a 13H5 es capaz de unirse a IFNAR sobre la superficie celular y la actividad biológica de IFN α se neutraliza por bloqueo de la señalización a través de IFNAR.

Ejemplo 9: Ensayos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo con 13H5

Como 13H5 puede asociarse con la superficie celular en presencia de IFN α , se investigó la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) usando un ensayo de liberación de 51 Cr. Se usaron células Raji como dianas para la lisis por células mononucleares humanas frescas. Las células mononucleares se purificaron de sangre completa heparinizada por centrifugación de densidad en Ficoll Hypaque. Las células diana se marcaron con 100 μ Ci de 51 Cr por 10^6 células durante 1 hora antes de dispensarlas en placas de microtitulación de fondo en U, 10^4 células por pocillo, y combinarlas con las células efectoras (proporción efector:diana = 50:1) más titulaciones de anticuerpo. Después de 4 horas de incubación a 37°C, el medio condicionado sobrenadante se recogió y analizó para la radiactividad. Se usó la liberación de radiactividad en ausencia de anticuerpo como control para el fondo y se usó tratamiento con detergente de las células diana para determinar la lisis del 100%. La citotoxicidad se calculó por la fórmula: % de lisis = (cpm experimental - cpm filtración diana)/(cpm lisis con detergente - cpm filtración diana) x 100%. Lisis específica = % de lisis con 13H5 - % lisis sin 13H5. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados del ensayo de ADCC, resumidos en la Figura 9, demuestran que 13H5 no tenía actividad ADCC significativa sobre células Raji, solo o en presencia de IFN α 2b. Asimismo, una IgG de isotipo coincidente no mostró actividad, mientras que el control positivo (Rituximab) mostró una fuerte citotoxicidad dependiente de la dosis. Estos resultados indican que la asociación mediada por IFN α de 13H5 con la superficie celular de células que expresan IFNAR no es suficiente para mediar la ADCC.

Ejemplo 10: Examen de la estabilidad de 13H5

El anticuerpo 13H5 contiene un sitio potencial de desamidación en Asn-55 en la región CDR2 de la cadena pesada. La desamidación de restos de asparagina es una modificación habitual de los polipéptidos y proteínas obtenidos usando tecnología de ADN recombinante y puede provocar una actividad y/o estabilidad disminuidas, aunque la desamidación no siempre se correlaciona con la pérdida de actividad biológica. La desamidación de asparaginas en forma de ácido aspártico (e iso-Asp) provoca un cambio en la carga neta, que puede detectarse por procedimientos analíticos basados en la carga. Para examinar la desamidación de 13H5 en condiciones aceleradas (pH básico), se usaron procedimientos para la detección de variantes desamidadas del fragmento Fab por IEX-HPLC y enfoque isoelectrónico capilar (cEIF).

Para acelerar la desamidación de 13H5, el anticuerpo se expuso a tampón a pH alcalino. Para el material de partida, se añadió una alícuota de 102 μ l de 13H5 (a 5,9, mg/ml para un total de 600 μ g) a 498 μ l de PBS y 6 μ l de solución madre de azida sódica 100X (solución al 2%). Para la muestra de PBS a tiempo cero, se combinaron 130 μ l de material de partida con 30 μ l de PBS y la muestra se puso a -20°C hasta el análisis posterior. Para la muestra a tiempo cero en tampones de desamidación, se combinaron 130 μ l de material de partida con 15 μ l de tampón de desamidación 10X (bicarbonato de amonio al 10%, pH 8,5) y 15 μ l de tampón de ajuste del pH (MES 1 M, pH 6,0) y se puso a -20°C hasta el análisis posterior. Para la muestra del día 2 en PBS, se combinaron 130 μ l de material de partida con 30 μ l de PBS y se incubaron a 40°C durante 48 horas y después la muestra se puso a -20°C hasta el análisis posterior. Para la muestra del día 2 en condiciones de desamidación, se combinaron 130 μ l de material de partida con 15 μ l de tampón de desamidación 10X y se incubaron a 40°C durante 48 horas. Después de 48 horas, se añadieron 15 μ l de tampón de ajuste del pH y la muestra se puso a -20°C hasta el análisis posterior.

Para preparar las muestras anteriores para el análisis, se realizó digestión con papaína. Las condiciones de reacción usadas fueron: 160 μ l de muestra (130 μ g de 13H5), 3,2 μ l de cisteína 50 mM y 6,5 μ l de enzima papaína a 1,0 mg/ml en solución. Las muestras se pusieron a 40°C durante 4 horas y la reacción se detuvo por la adición de 4,8 μ l de yodoacetamida 1 M. Después de digestión con papaína, se realizó SDS-PAGE no reductor para confirmar la presencia de fragmentos Fab y Fc.

Para realizar IEX-HPLC sobre las muestras, todas las muestras primero se dializaron frente a agua durante 3 horas. Después, se aplicaron 50 μ l de cada muestra a HPLC con las siguientes condiciones de cromatografía:

Columna = columna de intercambio catiónico débil Dionex WCX-10

Tampón "A" = MES 10 mM, pH 5,5

Tampón "B" = MES 10 mM, pH 5,5; NaCl 1,0 M

Elución = 4-25% de "B" durante 30 minutos a 0,8 ml/min

Detección = absorbancia UV a 280 nM

- 5 Los resultados del análisis IEX-HPLC se resumen en la Tabla 7 a continuación, que muestra las áreas de pico para Fab desamidado para muestras a tiempo cero y en el día 2 en condiciones de desamidación:

Tabla 7

Muestra	Área de pico de Fab desamidado	(% de área de pico) de Fab desamidado	Área de pico de Fab	(% de área de pico) de Fab	Área de pico total
Tiempo 0	89.244	6,13	1.366.233	93,87	1.455.477
Día 2	459.759	43,95	586.428	56,01	1.046.187

Para realizar el análisis cIEF, las muestras primero se dializaron frente a agua durante 3 horas y después se aplicaron a cIEF usando procedimientos convencionales de análisis. Los resultados del análisis cIEF se resumen en la Tabla 8 a continuación, que muestra las áreas de pico para Fab desamidado para muestras a tiempo cero y en el día 2 en condiciones de desamidación:

10

Tabla 8:

Muestra	Área de pico de Fab desamidado	(% de área de pico) de Fab desamidado	Área de pico de Fab	(% de área de pico) de Fab	Área de pico total
Tiempo 0	75.902	13,96	467.987	86,04	543.889
Día 2	251.317	58,81	176.040	41,19	427.357

Para examinar la dependencia en el pH de la desamidación forzada, se compararon los datos de IEX-HPLC para la muestra del día 2 en PBS (pH 7,0) con la muestra del día 2 en condiciones de desamidación. Los resultados se resumen en la Tabla 9 a continuación, que muestra las áreas de pico para el Fab desamidado para PBS en el día y el día 2 en condiciones de desamidación:

Tabla 9:

Muestra	Área de pico de Fab desamidado	(% de área de pico) de Fab desamidado	Área de pico de Fab	(% de área de pico) de Fab	Área de pico total
PBS	106.344	7,0	1.413.233	93,0	1.519.577
desamidata	459.759	43,95	586.428	56,01	1.046.187

- 15 Estos datos apoyan la teoría existente de degradación de proteínas, que predice la desamidación de polipéptidos mediante un mecanismo de desplazamiento de beta-aspartilo que sucede a una velocidad aumentada a pH básico en comparación con pH neutro.

Ejemplo 11: Preparación y caracterización de mutantes 13H5 con estabilidad potenciada

- 20 En este ejemplo, se prepararon mutantes 13H5 que tenían una sustitución de aminoácido en Asn-55 y se examinó la estabilidad de estos mutantes, en el día 2 en condiciones de desamidación forzada, por análisis cIEF como se ha descrito en el Ejemplo 10. Los mutantes se prepararon por técnicas convencionales de mutagénesis de ADN recombinante. Las secuencias de los mutantes en las posiciones aminoacídicas 55-58 de VH, en comparación con 13H5 de tipo silvestre, fueron las siguientes:

- 25
- | | |
|-------------------------|---|
| 13H5 de tipo silvestre: | N G N T (restos aminoacídicos 55-58 de la SEC ID N° 19) |
| Mutante n° 1: | D G N T (SEC ID N° 38) |
| Mutante n° 2: | Q G N T (SEC ID N° 39) |
| Mutante n° 3: | Q G Q T (SEC ID N° 40) |

Las secuencias de aminoácidos de V_H de longitud completa de los mutantes n° 1, n° 2 y n° 3 se muestran en las

SEC ID N° 34, 35 y 36, respectivamente.

Los resultados del análisis cIEF se muestran a continuación en la Tabla 10, que muestra las áreas de pico para Fab desamidado para el tipo silvestre y los mutantes en el día 2 en condiciones de desamidación: Tabla 10:

Muestra	Área de pico de Fab desamidado	(% de área de pico) de Fab desamidado	Área de pico de Fab	(% de área de pico) de Fab	Área de pico total
13H5 tipo silvestre	24.065	54,2	20.304	45,8	44.369
Mutante 1	10.382	9,7	96.584	90,3	106.966
Mutante 2	4.592	8,0	52.460	92,0	57.052
Mutante 3	7.733	8,9	79.077	91,1	86.810

5 Los resultados demuestran que cada uno de los tres mutantes Asn-55 muestra mayor estabilidad en condiciones de desamidación forzada que el anticuerpo 13H5 de tipo silvestre.

Sumario de la lista de secuencias

SEC ID N°	SECUENCIA	SEC ID N°	SECUENCIA
1	VH CDR1 a.a. 13H5	19	VH a.a. 13H5
2	VH CDR1 a.a. 13H7	20	VH a.a. 13H7
3	VH CDR1 a.a. 7H9	21	VH a.a. 7H9
4	VH CDR2 a.a. 13H5	22	VK a.a. 13H5
5	VH CDR2 a.a. 13H7	23	VK a.a. 13H7
6	VH CDR2 a.a. 7H9	24	VK a.a. 7H9
7	VH CDR3 a.a. 13H5	25	VH n.t. 13H5
8	VH CDR3 a.a. 13H7	26	VH n.t. 13H7
9	VH CDR3 a.a. 7H9	27	VH n.t. 7H9
10	VK CDR1 a.a. 13H5	28	VK n.t. 13H5
11	VK CDR1 a.a. 13H7	29	VK n.t. 13H7
12	VK CDR1 a.a. 7H9	30	VK n.t. 7H9
13	VK CDR2 a.a. 13H5	31	VH 1-18 línea germinal a.a.
14	VK CDR2 a.a. 13H7	32	VH 4-61 línea germinal a.a.
15	VK CDR2 a.a. 7H9		
		33	VK A27 línea germinal a.a.
16	VK CDR3 a.a. 13H5		
17	VK CDR3 a.a. 13H7	34	VH a.a. 13H5 N55D mut.
18	VK CDR3 a.a. 7H9	35	VH a.a. 13H5 N55Q mut.
		36	VH a.a. 13H5 N55Q mut. N57Q mut.
		37	VH a.a. 13H5 G56A mut.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-interferón alfa aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 1;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 4;
 - 5 (c) una CDR3 de de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N° 7;
 - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 10;
 - (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 13; y
 - (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N° 16.
2. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende:
 - 10 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22.
3. Un anticuerpo monoclonal anti-interferón alfa aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 34, 35, 36 y 37; y
 - 15 (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22.
4. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo inhibe la expresión superficial inducida por IFN de CD38 o MHC de clase I en células mononucleares periféricas.
5. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo inhibe la expresión inducida por IFN de IP-10 por células mononucleares periféricas.
6. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo inhibe el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma de lupus sistémico eritematoso (SLE).
7. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
8. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
9. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
10. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG 1 o IgG4.
11. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la parte de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo Fab.
12. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la parte de unión a antígeno es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv).
13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que la composición farmacéutica está liofilizada.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que la composición farmacéutica es una solución o dispersión acuosa.
16. Una composición que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, unido a un agente terapéutico.
18. El inmunoconjugado de la reivindicación 17, en el que el agente terapéutico es una citotoxina.
19. El inmunoconjugado de la reivindicación 17, en el que el agente terapéutico es un isótopo radiactivo.
20. Una composición que comprende el inmunoconjugado de la reivindicación 17, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, unida a un segundo resto funcional que tiene una diferente especificidad de unión que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo.
- 5 22. Una composición que comprende la molécula biespecífica de la reivindicación 21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
23. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
24. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 23.
25. Una célula huésped aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 24.
- 10 26. Un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
27. Un hibridoma preparado a partir de un ratón de la reivindicación 26, en el que el hibridoma produce dicho anticuerpo.
- 15 28. Un procedimiento *ex vivo* para inhibir la actividad biológica del interferón alfa que comprende poner en contacto el interferón alfa con el anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, de modo que se inhiba la actividad biológica del interferón alfa.
29. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso como medicamento.
- 20 30. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por interferón alfa en un sujeto en necesidad de tratamiento.
31. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 30, en el que la enfermedad o trastorno es lupus sistémico eritematoso.
- 25 32. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 30, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino-dependiente, psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide y glomerulonefritis.
33. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 30, en el que la enfermedad o trastorno es rechazo de trasplantes o enfermedad de injerto contra huésped.

Figura 1A

VH de 13H5 anti-IFN α

segmento V. 1-18
 segmento D: indeterminado
 segmento L: JH4b

```

1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S  V
      CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                CDR1 (SEC ID N° 1)
                                -----
55     K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  S  I  S  W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC AGC TAT AGT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  S  V  Y
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AGC GTT TAC

                                CDR2 (SEC ID N° 4)
                                -----
163    N  G  N  T  N  Y  A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  M  T  T
      AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA

217    D  T  S  T  S  T  A  Y  L  E  L  R  S  L  R  S  D  D
      GAC ACA TCC ACG AGC ACA GCC TAC CTG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                CDR3 (SEC ID N° 7)
                                -----
271    T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  P  I  A  A  G  Y  W  G  Q
      ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCC ATA GCA GCA GGC TAC TGG GGC CAG

325    G  T  L  V  T  V  S  S
      GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
                                (SEC ID N° 19)
                                (SEC ID N° 25)

```

Figura 1B

VK de 13H5 anti-IFN α

segmento V: A27
segmento J: JK1

```

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

                                CDR1 (SEC ID N° 10)
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S T Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG

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

      CDR2 (SEC ID N° 13)
      -----
163    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

      CDR3 (SEC ID N° 16)
      -----
                                (SEC ID N° 22)
271    Q Y G S S P R T F G Q G T K V E I K
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                                (SEC ID N° 28)

```

Figura 2A

VH de 13H7 anti-IFN α

segmento V: 4-61

segmento D: 3-10

segmento J: JH4b

```

1   Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  M  K  P  S  E  T  L
   CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG ATG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                     CDR1 (SEC ID N° 2)
-----
55  S  L  T  C  T  V  S  G  G  S  V  S  S  G  S  Y  Y  W
   TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT AGT TAC TAC TGG

-----
109 S  W  I  R  Q  P  P  G  M  G  L  E  W  I  G  Y  I  Y
   AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG ATG GGA CTG GAG TGG ATT GGT TAT ATC TAT

                                     CDR2 (SEC ID N° 5)
-----
163 S  G  G  G  A  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S
   TCC GGG GGA GGC GCC AAC TAC AAC CCT TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA

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

                                     CDR3 (SEC ID N° 8)
-----
271 D  T  A  V  Y  F  C  A  R  G  I  P  M  V  R  G  I  L
   GAC ACG GCC GTG TAT TTC TGT GCG AGA GGA ATT CCT ATG GTT CGG GGA ATT CTT

-----
325 H  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEC ID N° 20)
   CAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA (SEC ID N° 26)

```

Figura 2B

VK de 13H7 anti-IFN α

segmento V: A27

segmento J: JK2

```

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

                                CDR1 (SEC ID N° 11)
                                -----
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   F   L   A   W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTA GCC TGG

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

      CDR2 (SEC ID N° 14)
      -----
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

      CDR3 (SEC ID N° 17)
      -----
      Q   Y   G   S   S   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
                                (SEC ID N° 23)
                                (SEC ID N° 29)

```

Figura 3A**VH de 7H9 anti-interferón α**

segmento V: 1-18
segmento D: 6-6
segmento J: JH4b

```

1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S  V
      CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                CDR1 (SEC ID N° 3)
                                -----
55      K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  S  S  Y  G  I  S  W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC TTT TCC AGC TAT GGT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109     V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  S  A  Y
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGA CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AGC GCT TAC

                                CDR2 (SEC ID N° 6)
                                -----
163     N  G  N  T  N  Y  L  Q  K  L  Q  G  R  V  T  L  T  T
      AAT GGT AAC ACA AAC TAT CTA CAG AAG CTC CAG GGC AGA GTC ACC CTG ACC ACA

217     D  T  S  T  N  T  A  Y  M  E  L  R  S  L  R  S  D  D
      GAC ACA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                CDR3 (SEC ID N° 9)
                                -----
271     T  A  V  Y  Y  C  T  R  D  P  I  A  A  G  Y  W  G  Q
      ACG GCC GTG TAT TAC TGT ACG AGA GAT CCC ATA GCA GCA GGT TAC TGG GGC CAG

325     G  T  L  V  T  V  S  S      (SEC ID N° 21)
      GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA      (SEC ID N° 27)

```

Figura 3B

VK de 7H9 anti-interferón α

segmento V: A27
 segmento J: JK1

```

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

                                CDR1 (SEC ID N° 12)
                                -----
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   T   Y   L   A   W
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG

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

      CDR2 (SEC ID N° 15)
      -----
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163  AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

      CDR3 (SEC ID N° 18)
      -----
                                (SEC ID N° 24)
      Q   Y   G   S   S   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                                (SEC ID N° 30)
  
```

Región V_H anti-IFN α

Linea germinal 1-18:	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	G	I	S	W	V	R	Q		
13H5 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7H9 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Linea germinal 1-18:	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	S	A	Y	N	G	N	T	N	Y	A	Q	K	L	Q	G	R	V	T	M	T	T	D	T	S	T	S	T		
13H5 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7H9 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Linea germinal 1-18:	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	C	A	R																						
13H5 V _H :	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7H9 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Figura 4

Región V_H anti-IFN α

Linea germinal 4-61: Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P
13H7 VH: - - - - - M - - - - - CDR1 - - - - -

Linea germinal 4-61: P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L
13H7 VH: - - M - - - - - S G - G A - - - - - CDR2 - - - - -

(SEC ID N° 32) S S V T A A D T A V Y Y C A R - - - - - CDR3 - - - - -
Linea germinal 4-61: N - - - - - F - - - - - G I P M V R G I L H Y W G Q G T L V T V S S (JH4b)
13H7 VH: - - - - -

Figura 5

Región V_K anti-IFN α

Linea germinal A27:	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A
13H5 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7H9 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13H7 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Linea germinal A27:	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T
13H5 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7H9 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13H7 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Linea germinal A27:	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13H5 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7H9 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13H7 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Figura 6

Figura 7

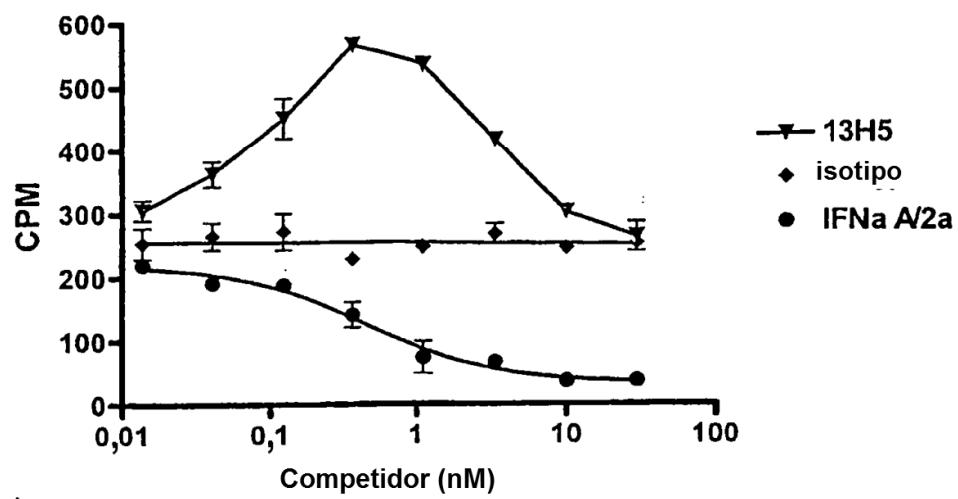


Figura 8

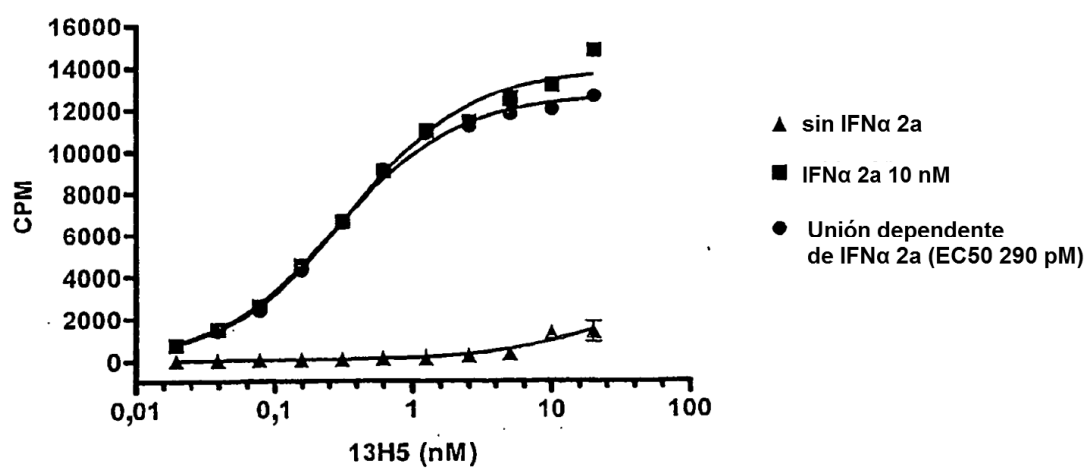


Figura 9

