

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 495**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2007 E 07786719 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2027157**

54 Título: **Anticuerpos humanizados modificados anti-interleucina-18**

30 Prioridad:

**25.05.2006 GB 0610438**

**05.06.2006 GB 0611046**

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

**28.10.2014**

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ELLIS, JONATHAN HENRY;  
GERMASCHEWSKI, VOLKER;  
HAMBLIN, PAUL ANDREW y  
KIRBY, IAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 514 495 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 humanizados modificados anti-interleucina-18

**1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente al campo de las inmunoglobulinas tales como anticuerpos y en concreto a anticuerpos humanizados, útiles en el tratamiento y diagnóstico de afecciones mediadas por interleucina-18 humana.

**2. Antecedentes de la invención**

La interleucina-18 humana (hIL-18) es una citocina que se sintetiza como una proteína precursora de 193 aminoácidos biológicamente inactiva (Ushio y col., J. Immunol. 156:4274, 1996). La escisión de la proteína precursora, por ejemplo mediante caspasa-1 o caspasa-4, libera la proteína madura de 156 aminoácidos (Gu y col., Science 275:206, 1997; Ghayur y col., Nature 386:619, 1997), que muestra actividades biológicas que incluyen la co-estimulación de la proliferación de linfocitos T, la potenciación de la citotoxicidad de linfocitos citolíticos naturales, la inducción de la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales, y la potenciación de la diferenciación de linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) (Okamura y col., Nature 378:88, 1995; Ushio y col., J. Immunol. 156:4274, 1996; Micallef y col.; Eur. J. Immunol. 26:1647, 1996; Kohno y col., J. Immunol. 158:1541, 1997; Zhang y col., Infect. Immunol 65:3594, 1997; Robinson y col., Immunity 7:571, 1997). Además, IL-18 es una inductora eficaz de los mediadores proinflamatorios monocíticos humanos, incluyendo IL-8, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), y prostaglandina E 2 (PGE 2) (Ushio, S. y col., J. Immunol. 156:4274-4279, 1996; Puren, A. J. y col., J. Clin. Invest. 10:711-721, 1997; Podolin y col., J. Immunol. remitido, 1999).

La proteína relacionada con el receptor de IL-1 (IL-1Rrp) clonada anteriormente (Parnet y col., J. Biol. Chem. 271:3967, 1996) se identificó como una subunidad del receptor de IL-18 (Kd=18 nM) (Torigoe y col., J. Biol. Chem. 272:25737, 1997). Una segunda subunidad del receptor de IL-18 muestra homología con la proteína accesoria del receptor de IL-1, y se ha denominado AcPL (del inglés accessory protein-like, proteína accesoria relacionada). La expresión de tanto IL1Rrp como de AcPL es necesaria para la activación de NF- $\kappa$ B y JNK inducida por IL-18 (Born y col., J. Biol. Chem. 273:29445, 1998). Además de NF- $\kappa$ B y JNK, IL-18 señala mediante la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK), p56lck (LCK), y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Micallef y col., Eur. J. Immunol. 26:1647, 1996; Matsumoto y col., Biophys Biochem. Res. Comm. 234:454, 1997; Tsuji- Takayama y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 237:126, 1997).

Los linfocitos TH1 que producen citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  (Mosmann y col., J. Immunol. 136:2348, 1986). se han implicado en la mediación de muchas enfermedades autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), diabetes tipo 1 o insulino dependiente (DMID), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), y psoriasis (Mosmann y Sad, Immunol. Today 17:138, 1996). Por tanto, puede esperarse que el antagonismo de una citocina que promueva a TH1 tal como IL-18 inhiba el desarrollo de la enfermedad. Pueden usarse AcM específicos para IL-18 como antagonistas.

Se ha demostrado el papel de IL-18 en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por consiguiente, se ha demostrado que la expresión de IL-18 está aumentada significativamente en el páncreas y bazo de ratones diabéticos no obesos (NOD) inmediatamente antes de la aparición de la enfermedad (Rothe y col., J. Clin. Invest. 99:469, 1997). De manera similar, se ha demostrado que los niveles de IL-18 están elevados de manera destaca en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Kawashima y col., Arthritis and Rheumatism 39:598, 1996). Además, se ha demostrado que la administración de IL-18 aumenta la gravedad clínica de encefalomielitis alérgica experimental murina (EAE), una enfermedad autoinmune mediada por Th1 que es un modelo para esclerosis múltiple. Además, se ha demostrado que neutralizar antisuero anti-IL-18 de rata previene el desarrollo de EAE en ratas Lewis hembra (Wildbaum y col., J. Immunol. 161:6368, 1998). Por consiguiente, IL-18 es una diana deseable para el desarrollo de un agente terapéutico nuevo para autoinmunidad.

Taniguchi y col., J. Immunol. Methods 206:107, describen siete anticuerpos monoclonales (AcM) murinos anti-IL-18 humana y seis de rata, que se unen a cuatro sitios antigénicos distintos. Uno de los AcM murinos (N<sup>o</sup> 125-2H), y los siete AcM de rata inhiben la producción de IFN- $\gamma$  por células KG-1 inducida por IL-18, mostrando los AcM de rata actividades neutralizantes 10 veces más bajas que aquellas de N<sup>o</sup> 125-2H. Como se demuestra mediante análisis de transferencia de Western, tres de los AcM murinos, pero ninguno de los AcM de rata, son fuertemente reactivos con IL-18 humana unida a membrana. Además, se describe un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) para detectar IL-18 humana, utilizando N<sup>o</sup> 125-2H y un AcM de rata. El límite de detección de este ELISA es de 10 pg/ml.

La solicitud de patente europea EP 0 712 931 desvela dos AcM de ratón anti-IL-18 humana, H1 (IgG 1) y H2 (IgM). Como se demuestra mediante análisis de transferencia de Western, ambos AcM reaccionan con IL-18 humana unida a membrana, pero no con IL-12 humana unida a membrana. H1 se utiliza en un protocolo de cromatografía de inmunoafinidad para purificar IL-18 humana, y en un ELISA para medir IL-18 humana. H2 se utiliza en un radioinmunoensayo para medir IL-18 humana.

El documento WO 0056771 desvela un AcM de rata 2C10 que tiene las CDR como se expone en las SEC ID N<sup>o</sup>: 1-6. El

documento WO 0056771 también desvela 2C10 humanizado que comprende estas CDR.

5 Neutralizar anticuerpos de IL-18 puede ser potencialmente útil para aliviar enfermedades autoinmunes y síntomas relacionados en el ser humano. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica para un antagonista de IL-18 de alta afinidad, tal como un anticuerpo monoclonal neutralizante para interleucina 18 humana, que reduciría la diferenciación y proliferación de linfocitos Th1 y por consiguiente las enfermedades autoinmunes y síntomas relacionados.

### 3. Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo humanizado anti-interleucina-18 como se define en las reivindicaciones.

10 Dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que tienen las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

15 CDRH1: SEC ID N°: 1  
 CDRH2: SEC ID N°: 2  
 CDRH3: SEC ID N°: 3  
 CDRL1: SEC ID N°: 4  
 CDRL2: SEC ID N°: 5  
 CDRL3: SEC ID N°: 6

El resto en la posición 71 de la cadena ligera está sustituido por el resto correspondiente encontrado en el anticuerpo donante del que se derivan las CDR, es decir, un resto de tirosina.

20 Será evidente para los expertos en la técnica que el término "derivado" pretende definir no solo la fuente en el sentido de ser el origen *físico* del material, sino también para definir el material que es estructuralmente idéntico al material, pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Por lo tanto, el resto correspondiente "encontrado en el marco conservado del anticuerpo del que se derivan las CDR" no necesitan necesariamente purificarse a partir del marco conservado del anticuerpo donante. De manera similar, las CDR "derivadas de un anticuerpo donante" no necesitan necesariamente purificarse a partir del anticuerpo donante.

25 Las CDR y las regiones de marco conservado (FR) y numeración de aminoácidos siguen, a menos que se indique lo contrario, la definición de Kabat como se expone en Kabat y col, "Sequences of immunological interest", NIH.

La cadena ligera y/o la cadena pesada son preferentemente no inmunogénicas en un paciente humano.

30 La divulgación proporciona un anticuerpo humanizado en el cual las CDR anteriormente mencionadas se injertan en un marco conservado aceptor de cadena ligera humana en el que dicho marco conservado aceptor de cadena ligera comprende las regiones de marco conservado derivadas de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 38.

La divulgación también proporciona un anticuerpo humanizado anti-interleucina-18, el cual muestra una constante de equilibrio (KD) de 300 pM o menos respecto a la unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore™, usando preferentemente un instrumento Biacore™ 3000 y condiciones como las expuestas en 8.4.1 más adelante) a 37 °C.

35 Preferentemente, la constante de equilibrio (KD) del anticuerpo respecto a la unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (preferentemente usando un instrumento Biacore™ T100 y condiciones como las expuestas en 8.4.2 más adelante) a 37 °C es menor de 90 pM. Más preferentemente, la constante de equilibrio es de 70 pM o menor y aún más preferentemente, 65 pM, 60 pM, 55 pM, o 50 pM o menor.

40 La divulgación también proporciona un anticuerpo humanizado anti-interleucina-18, el cual anticuerpo muestra una constante de disociación o tasa inversa (*kd*) de 0,0002 1/s o menos respecto a la unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore™, usando preferentemente un instrumento Biacore™ T100 y condiciones como las expuestas en 8.4.2 más adelante) a 37 °C.

45 La divulgación proporciona un anticuerpo humanizado anti-interleucina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que una proporción entre tasa inversa (*kd*) de dicho anticuerpo respecto a la unión a IL-18 humana a 25 °C a la tasa inversa (*kd*) de dicho anticuerpo respecto a la unión a IL-18 humana a 37 °C es 1:5 o menor. La tasa inversa se mide preferentemente usando un instrumento Biacore™ y condiciones como las expuestas en 8.4.2 más adelante.

50 La divulgación proporciona un anticuerpo humanizado anti-interleucina-18 que comprende una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 21; y una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 29.

En concreto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado anti-interleucina-18 que comprende una cadena pesada de SEC ID N°: 9 y una cadena ligera de SEC ID N°: 13.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-interleucina-18 como se describe anteriormente y reivindica en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La divulgación proporciona un procedimiento para seleccionar un anticuerpo (en concreto un anticuerpo que inhibe la interacción entre un ligando y un receptor tal como un anticuerpo anti-interleucina-18) para uso terapéutico, el cual procedimiento comprende:

(a) medir la afinidad de unión (usando, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, tal como Biacore™) del anticuerpo por un antígeno al que se une el anticuerpo específicamente a una temperatura de entre 30 a 45 °C (preferentemente 37 °C);

10 (b) medir la afinidad de unión (usando, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, tal como Biacore™) del anticuerpo por un antígeno al que se une el anticuerpo específicamente a una temperatura de entre 20 a 25 °C (preferentemente 25 °C);

15 (c) seleccionar dicho anticuerpo para uso terapéutico si la afinidad de (a) es mayor que la afinidad de (b), preferentemente si dicha afinidad de (a) es 2 o más veces mayor, más preferentemente 4 veces mayor o más que la afinidad de la etapa (b).

La divulgación también proporciona un procedimiento para seleccionar un anticuerpo (en concreto un anticuerpo que inhibe la interacción entre un ligando y un receptor tal como un anticuerpo anti-interleucina-18) para uso terapéutico, el cual procedimiento comprende:

20 (a) medir la tasa inversa (usando por ejemplo resonancia de plasmón superficial tal como Biacore™) del anticuerpo respecto del antígeno al que el anticuerpo se une específicamente, a una temperatura entre 30 a 45 °C (preferentemente 37 °C);

(b) medir la tasa inversa (usando por ejemplo resonancia de plasmón superficial tal como Biacore™) del anticuerpo respecto del antígeno al que el anticuerpo se une específicamente, a una temperatura entre 20 a 25 °C (preferentemente 25 °C);

25 (c) seleccionar dicho anticuerpo para uso terapéutico si la tasa inversa de (a) es más lenta que la tasa inversa de (b).

30 El término "anti-interleucina-18" al referirse a anticuerpos de la invención significa que dichos anticuerpos son capaces de neutralizar la actividad biológica de la interleucina-18 humana. No excluye, sin embargo, que dichos anticuerpos puedan neutralizar además la actividad biológica de la interleucina-18 de un primate no humano (por ejemplo, de rhesus y/o cynomolgus).

### **Breve descripción de las figuras**

La invención se describirá adicionalmente a continuación en referencia a las figuras, en las cuales:

La Figura 1 muestra el efecto de la temperatura sobre la tasa directa ( $ka$ ) de H1L1 y H1L2;

La Figura 2 muestra el efecto de la temperatura sobre la tasa inversa ( $kd$ );

35 La Figura 3 muestra el efecto de la temperatura sobre constante de equilibrio (KD);

Las Figuras 4A-4C muestran datos representativos de un experimento que generó los valores de CE50 ilustrados en la tabla 7;

La Figura 5 muestra los valores de CE50 de unión de cuatro variantes humanizadas seleccionadas unidas a IL18 humana;

40 La Figura 6 muestra los valores de CE50 de unión de cuatro variantes humanizadas seleccionadas unidas a IL18 de rhesus;

La Figura 7 muestra la unión de H1L2 a IL18 humana en presencia de fluido sinovial al 50 %;

La Figura 8 muestra la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por IL18 en un ensayo de KG1;

45 Las Figuras 9A y 9B muestran la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por LPS en un donante de PBMCS humano en suero autólogo al 10 % y 25 % respectivamente;

La Figura 10 muestra la unión de 2C10 a hIL18 capturada por hIL18PU;

La Figura 11 muestra la capacidad de nueve variantes humanizadas para inhibir la liberación de IFN- $\gamma$  estimulada por IL18 en células KG1;

La Figura 12 muestra la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por IL-18 por las variantes H1 y 2C10 en células KG1;

La Figura 13 muestra los datos de IC50 para las variantes H1 con un intervalo de confianza del 95 %;

La Figura 14 muestra la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por IL-18 humana en células KG1;

5 La Figura 15 muestra la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por IL-18 de rhesus en células KG1;

La Figura 16 muestra los resultados de un ELISA de unión de IL-18 humana usando 2C10 quimérico;

La Figura 17 muestra los resultados de un ELISA de unión de IL-18 de rhesus usando 2C10 quimérico; y

Las Figuras 18A y 18B muestran los resultados de los ELISA de unión usando H1L2 y 2C10 respectivamente, uniéndose a IL-18 humana unida a IL-18PU.

#### 10 **4. Anticuerpos humanizados**

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos trae consigo los problemas ahora bien establecidos de inmunogeneicidad potencial, especialmente tras la administración repetida del anticuerpo. Esto es, el sistema inmune del paciente puede reconocer al anticuerpo no humano intacto como no propio y desencadenar una respuesta neutralizante. Además de desarrollar anticuerpos completamente humanos (ver más arriba), se han desarrollado varias técnicas a lo largo de los años para superar estos problemas y generalmente incluyen reducir la composición de secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico intacto mientras que se mantiene la facilidad relativa de obtención de anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado, por ejemplo, un ratón, rata o conejo. Se han usado ampliamente dos enfoques para lograr esto. El primero es anticuerpos quiméricos, que comprenden generalmente un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor como un ratón) fusionado con una región constante humana, véase Morrison (1984), PNAS, 81, 6851. Debido a que el sitio de unión a antígeno del anticuerpo se localiza en sus regiones variables, el anticuerpo quimérico mantiene su afinidad de unión al antígeno pero adquiere las funciones de efector de la región constante humana y es por tanto capaz de desarrollar funciones de efector como las descritas anteriormente. Los anticuerpos quiméricos se producen típicamente usando procedimientos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) se aísla y secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo, ADN que codifica las SEC ID N<sup>o</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, y 6 descritas anteriormente). Las células de hibridoma sirven como fuente típica de dicho ADN. Si se desea expresar el anticuerpo quimérico, los ADNc aislados que codifican las regiones variables maduras completas de las cadenas ligera y pesada se insertan en el marco de vectores de expresión adecuados que contienen, entre otros, regiones constantes de inmunoglobulina adecuadas, generalmente de origen humano, junto con secuencias de señalización, codones de terminación, promotores, terminadores y otros elementos según sea necesario para obtener la expresión del anticuerpo. Dichos vectores se transfectan a continuación a células hospedadoras tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que no producen de otro modo la proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante para cadenas L y H humanas por las regiones constantes L y H correspondientes no humanas (por ejemplo, murinas) véase, por ejemplo, Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

El segundo enfoque incluye la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce humanizando las regiones variables. Han alcanzado popularidad dos técnicas para la humanización. La primera es humanización por injerto de CDR. Las CDR forman bucles cercanos al N-terminal del anticuerpo donde forman una superficie montada en una estructura proporcionada por las regiones de marco conservado. La especificidad de unión a antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y las características químicas de su superficie de CDR. Estas características se determinan a su vez por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR, y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los restos que comprenden las CDR. Puede lograrse una gran disminución de la inmunogeneicidad injertando solo las CDR de anticuerpos (anticuerpos "donantes") no humanos (por ejemplo, murinos) en regiones de marco conservado ("marco conservado aceptor") y constantes humanas adecuadas (véase Jones y col (1986) Nature 321,522-525 y Verhoeyen M y col (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, Injertar CDR *per se* puede no dar como resultado el mantenimiento de las propiedades de unión a antígeno y se encuentra frecuentemente que algunos restos de marco conservado del anticuerpo donante tienen que preservarse (algunas veces citados como "retromutaciones") en la molécula humanizada si se quiere recuperar una afinidad de unión a antígeno significativa (véase Queen C y col (1989) PNAS 86, 10.029-10.033, Co, M y col (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, las regiones V humanas que muestran la mayor homología de secuencia (típicamente del 60 % o mayor) con el anticuerpo donante no humano pueden seleccionarse a partir de una base de datos para proporcionar la región de marco conservado (FR) humana. La selección de las FR humanas puede efectuarse bien a partir de anticuerpos humanos consenso o individuales. En caso necesario, se sustituyen restos clave del anticuerpo donante en la región de marco conservado aceptor humana para preservar las conformaciones de CDR. Puede usarse diseño asistido por ordenador para ayudar a identificar dichos restos estructuralmente importantes, véase el documento WO99/48523.

Como alternativa, La humanización puede lograrse mediante un procedimiento de "chapado". Un análisis estadístico de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas y murinas únicas reveló que los patrones precisos de restos expuestos son diferentes en anticuerpos humanos y murinos, y la mayor parte de las posiciones superficiales individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de restos distintos (véase Padlan E.A. y col; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 y Pedersen J.T. y col (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogeneidad de un Fv no humano reemplazando restos expuestos en sus regiones de marco conservado que difieran de aquellas que se encuentran frecuentemente en anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad protéica puede correlacionarse con la accesibilidad superficial, el reemplazo de los restos superficiales puede ser suficiente para hacer que la región variable de ratón sea "invisible" al sistema inmune humano (véase también Mark G.El y col (1994) en Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se cita como "chapado" ya que solo se altera la superficie del anticuerpo, los restos de soporte permanecen inalterados. Los enfoques alternativos adicionales incluyen al expuesto en el documento WO04/006955 y al procedimiento de Humaneering™ (Kalobios), que hace uso de sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos que son próximos en secuencia a la línea germinal humana (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, enero 2007, San Diego, California). Otro enfoque reciente de humanización incluye seleccionar marcos conservados aceptores humanos basándose en la similitud estructural de las regiones CDR humanas con aquellas regiones CDR del anticuerpo de ratón donante en vez de en la homología entre otras regiones del anticuerpo tales como las regiones de marco conservado. Este procedimiento también se conoce como Superhumanisation™ (Evogenix Inc.; Hwang y col (2005) Methods 36:35-42).

Por tanto, la presente invención concierne a anticuerpos humanizados como se expone en la sección 3 anterior y como se definen en las reivindicaciones. Dichos anticuerpos humanizados comprenden preferentemente una región constante humana de un isotipo de IgG, tal como IgG1 o IgG4.

Las regiones variables humanizadas como se exponen en la sección 3 anterior pueden fusionarse con una región constante no humana ("quimera inversa") tal como un primate no humano, rata, murino o conejo.

Por supuesto, será evidente para los expertos en la técnica que los marcos conservados aceptores expuestos en las SEC ID N°: 37 y 38 constituyen aminoácidos de inmunoglobulina codificados por un gen VH y Vkappa respectivamente. Como tales, estos comprenden tanto las regiones de marco conservado y las CDR del anticuerpo aceptor. Se encuentra dentro de las capacidades del experto sustituir las CDR del anticuerpo aceptor con las CDR donantes expuestas en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y asociar las secuencias resultantes con secuencias de marco conservado 4 adecuadas tales como aquellas expuestas en SEC ID N°: 39 y SEC ID N°: 40, para producir una región variable completa de inmunoglobulina como se expone en SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 15.

#### 4.1. Otras modificaciones

Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y varios receptores de Fc (FcγR) media las funciones de efector del anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis y vida media/aclaramiento del anticuerpo. Pueden efectuarse varias modificaciones de la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad de efector deseada. Por ejemplo, se detallan mutaciones en la región Fc para hacer que un anticuerpo que de otro modo es lítico, no sea lítico, en los documentos EP 0 629 240 B1 y EP 0 307 434 B2 o puede incorporarse un epítipo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo para aumentar la vida media en suero, véase el documento US 5.739.277. Actualmente hay cinco receptores Fcγ humanos reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y col, (2001) J. Biol. Chem 276, 6591-6604 demostraron que un conjunto común de restos de IgG1 está involucrado en la unión a todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este conjunto común. Un grupo de restos de IgG1 redujeron la unión a todos los FcγR cuando se alteraron a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y agrupados cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Mientras que FcγRI utiliza únicamente el conjunto común de restos de IgG1 para la unión, FcγRII and FcγRIII interactúan con distintos restos además del conjunto común. La alteración de algunos restos redujo la unión únicamente a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no afectaron a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267 Ala mejoró la unión a FcγRII pero la unión a FcγRIII no se vio afectada). Otras variantes mostraron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción en la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298 Ala mejoró la unión a FcγRIII y redujo la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las variantes de IgG1 que se unían mejor habían combinado sustituciones de alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor FcRn neonatal está involucrado tanto en el aclaramiento del anticuerpo y la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans R.P. (1997) Immunol. Res. 16, 29-57 y Ghetie y col (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Los restos de IgG1 humana determinados para interactuar directamente con FcRn humano incluyen Ile-253, Ser-254, Lys-288, Thr-307, Gln-311, Asn-434 e His-435. La presente invención por tanto concierne a anticuerpos de la invención que tienen uno cualquiera (o más) de los cambios de restos detallados anteriormente para modificar la vida media/aclaramiento y/o funciones de efector tales como ADCC y/o lisis de complemento.

Otras modificaciones incluyen variantes de glucosilación de los anticuerpos de la invención. Se sabe que la glucosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un profundo efecto en la

función del anticuerpo, particularmente en el funcionamiento de efector tal como aquellos descritos anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd y col (1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318. Se contemplan variantes de glucosilación de los anticuerpos terapéuticos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención en las que se añaden, sustituyen, eliminan o modifican uno o más restos de hidrato de carbono. La introducción de motivos asparragina-X-serina o asparragina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de restos de hidratos de carbono y puede por tanto usarse para manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y col (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 se aumentó la sialización terminal de un TNFR-IgG inmunoconjugado mediante un procedimiento de regalactosilación y/o resialización usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3-sialiltransferasa. Se cree que aumentar la sialización terminal aumenta la vida media de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de glicoproteínas, se producen típicamente en la naturaleza como una mezcla de glicoformas. La mezcla es particularmente evidente cuando se producen anticuerpos en eucariotas, en particular, en células de mamífero. Se han desarrollado una variedad de procedimientos para fabricar glicoformas definidas, véase Zhang y col, *Science* (2004), 303, 371, Sears y col, *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker y col, (2002) *Science*, 298 1790, Davis y col, (2002) *Chem. Rev.* 102, 579, Hang y col, (2001) *Acc. Chem. Res.* 34, 727. Por lo tanto, la invención concierne una variedad de anticuerpos (típicamente monoclonales) terapéuticos (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) como se describen en el presente documento que comprenden un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo 5 o menos tal como dos o una sola) de glicoforma(s) de dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos acoplados a polímeros no proteicos tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la vida media de proteínas, así como para reducir la antigenicidad e inmunogeneicidad de proteínas. El uso de la PEGilación con distintos pesos moleculares y estilos (lineales o ramificados) se ha investigado con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y col (2000) *Int. J. Pharmaceut.* 198:83-95.

## 5. Procedimientos de producción

Pueden producirse anticuerpos de la presente invención en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y col (1999), *J. Immunol. Methods* 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55), ratones (véase Pollock y col, anteriormente citado) o plantas (véase Doran PM, (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 199-204, Ma JK-C (1998), *Nat. Med.* 4; 601-606, Baez J y col, *BioPharm* (2000) 13: 50-54, Stoger E y col; (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). También pueden producirse anticuerpos mediante síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención se producen típicamente usando tecnología de cultivo de células recombinantes bien conocida para los expertos en la técnica. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla e inserta en un vector replicable tal como un plásmido para clonación posterior (amplificación) o expresión en una célula hospedadora. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintasa (como el vendido por Lonza Biologics), particularmente en los casos donde la célula hospedadora es CHO o NS0 (ver más adelante). Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótidos). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los cuales los plásmidos son una realización típica. En general, dichos vectores incluyen además una secuencia de señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de la cadena pesada y/o ligera para facilitar la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados e introducirse (por ejemplo, mediante transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula hospedadora de manera concurrente o secuencial o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.

Será evidente de manera inmediata para los expertos de la técnica que debido a la redundancia del código genético, también están disponibles polinucleótidos alternativos a los desvelados en el presente documento que codificarán a los polipéptidos de la invención.

### 5.1 Secuencias de señal

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse como una proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el N-terminal de la proteína madura. La secuencia de señal debe reconocerse y procesarse por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas, la secuencia de señal pueden ser líderes una fosfatasa alcalina, penicilinasasa, o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción por levaduras, las secuencias de señal pueden ser un líder de invertasa de levadura, líder de factor  $\alpha$  o líderes de fosfatasa ácida, véase, por ejemplo, el documento WO90/13646. En sistemas de células de mamífero, están disponibles líderes de secreción viral tales como la señal gD de herpes simplex y una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa (tal como la cadena pesada de Ig humana). La secuencia de señal está típicamente ligada, en marco de lectura para el polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

### 5.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación se conocen bien en la técnica siendo pBR322 adecuado para la mayoría de bacterias

gram-negativas, plásmido 2µ para la mayoría de las levaduras y varios orígenes virales tales como SV40, polio, adenovirus, VEV o VPB para la mayoría de células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamíferos integrados, a menos que la propagación del vector sea necesaria en *E. coli*. Sin embargo, puede usarse el origen SV40 ya que contiene el promotor temprano.

5 **5.3 Marcador de selección**

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxotróficas o proporcionan nutrientes no disponibles en el medio complejo o (c) combinaciones de ambos. El esquema de selección puede incluir detener el crecimiento de las células hospedadoras que no contienen vector o vectores. Las células, que se han transformado con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido a, por ejemplo, resistencia a fármacos conferida por los marcadores de selección dispensado de manera conjunta. Un ejemplo es el sistema de selección de DHFR en el que los transformantes se generan en cepas hospedadoras negativas en DHFR (véase, por ejemplo, Page y Sydenham 1991 *Biotechnology* 9: 64-68). En este sistema, el gen de DHFR se dispensa de manera conjunta con secuencias de polinucleótidos de anticuerpo de la invención y las células positivas en DHFR se seleccionan a continuación mediante retirada de nucleósidos. En caso necesario, el inhibidor de DHFR, metotrexato, también se emplea para seleccionar transformantes con amplificación del gen DHFR. Uniendo operativamente el gen de DHFR a las secuencias codificantes del anticuerpo de la invención o derivados funcionales de los mismos, la amplificación del gen de DHFR da como resultado la amplificación concomitante de las secuencias de interés del anticuerpo deseado. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para esta selección por DHFR/metotrexato y los procedimientos para amplificar y seleccionar células hospedadoras que usan el sistema DHFR están bien establecidos en la técnica, véase Kaufman R.J. y col J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, para revisión, véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", *Arzneimittel- Forschung*. 48(8):870-80, agosto 1998. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión de glutamato sintasa (Lonza Biologics). Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1*; véase Stinchcomb y col, *Nature* 282, 38, 1979.

**5.4 Promotores**

Los promotores adecuados para expresar anticuerpos de la invención se unen operativamente al ADN/polinucleótido que codifica al anticuerpo. Los promotores para hospedadores procariontes incluyen el promotor *phoA*, los sistemas de promotor beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos como *Tac*. Los promotores adecuados para expresión en células de levadura incluyen 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucocinasa. Los promotores de levadura inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o utilización de maltosa/galactosa.

Los promotores para expresión en sistemas de células de mamífero incluyen promotores de ARN polimerasa II incluyendo promotores virales tales como polio, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor génico temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR) y los promotores tempranos y tardíos del virus de simio 40 y no víricos tales como EF-1alfa (Mizushima y Nagata, *Nucleic Acids Res.* 1990, 18(17):5332. La elección del promotor puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

**5.5 Elemento potenciador**

En los casos donde sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en vez de o además de aquellos que se encuentran localizados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotioneína e insulina. Como alternativa, puede usarse un elemento potenciador de un virus de células eucariotas tal como el potenciador de SV40, potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador de polio, potenciador de baculovirus o locus de IgG2a murina (véase el documento WO04/009823). Mientras que los potenciadores se localizan típicamente en el vector en el sitio cadena arriba del promotor, también pueden localizarse en cualquier otro lado, por ejemplo, entre la región no traducida o cadena abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posicionamiento del potenciador puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para expresión.

**5.6 Poliadenilación/terminación**

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación se unen operativamente al polinucleótido que codifica al anticuerpo de la presente invención. Dichas señales se colocan típicamente 3' del marco de lectura abierto. En sistemas de mamífero, las señales de ejemplo no limitantes incluyen aquellas derivadas de hormonas de crecimiento, factor-1-alfa de elongación y genes virales (por ejemplo de SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de levaduras, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen aquellas



derivadas los genes de fosfoglicerato cinasa (PGK) y de alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas procariotas, las señales de poliadenilación típicamente no son necesarias y en su lugar es frecuente usar secuencias más cortas y más definidas de terminación. La selección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

## 5 **5.7 Otros procedimientos/elementos para rendimientos potenciados**

Además de los anteriores, otras características que pueden emplearse para potenciar rendimientos incluyen elementos de remodelado de cromatina, intrones y modificación de codones específicos de la célula hospedadora. El uso de codones del anticuerpo de la presente invención puede modificarse para acomodarse al sesgo de codones de la célula hospedadora de modo que aumente la transcripción y/o el rendimiento del producto (por ejemplo, Hoekema A et al Mol Cell Biol 1987 7(8):2914-24). La elección de codones puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

## **5.8 Células hospedadoras**

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar vectores que codifican anticuerpos de la invención son procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli* (por ejemplo, ATCC 31.446; 31.537; 27.325). *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella proteus*, *Salmonella* por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia* por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella* así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase el documento DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P.aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células hospedadoras de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, ATCC 16.045; 12.424; 24.178; 56.500). *yarrowia* (documento EP402.226), *Pichia Pastoris* (documento EP183.070, véase también Peng y col, J. Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (documento EP244.234). *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus*, hospedadores tales como *A.nidulans* y *A.niger* también se contemplan.

Aunque se contemplan específicamente células hospedadoras procariotas y de levadura por la invención, típicamente, sin embargo, las células hospedadoras de la presente invención son células de vertebrados. Las células hospedadoras de vertebrado adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, PerC6 (Crucell), células de riñón de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (ATCC N° CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo, CHO-K1, ATCC N° CCL 61, línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub y col, (1986) anteriormente citado), en particular aquellas líneas celulares CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células de sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL 1587), células HELA, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 y de mieloma o linfoma por ejemplo, NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

Por lo tanto, en una realización de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada de manera estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico como se describe en el presente documento. Típicamente, dichas células hospedadoras comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Dichas células hospedadoras pueden además modificarse mediante ingeniería genética o adaptarse para modificar la calidad, función y/o rendimiento del anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos no limitantes incluyen la enzimas de expresión o de modificación específica (por ejemplo, glucosilación) y chaperonas de plegamiento de proteínas.

## **5.9 Procedimientos de cultivo celular**

Las células hospedadoras transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento conocido para los expertos en la técnica. Las células hospedadoras pueden cultivarse en frascos de centrifugación, frascos de agitación, botellas rotatorias o sistemas de fibra hueca, pero se prefieren reactores en tanque agitado para producción a mayor escala o reactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) se usan para cultivos en suspensión. Los tanques agitados están adaptados típicamente para aireación usando, por ejemplo, rociadores, deflectores o impulsores de baja cizalla. Para columnas de burbujas y reactores de transporte aéreo, puede usarse aireación directa con burbujas de oxígeno. En los casos donde las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo libre de suero, se prefiere que el medio esté suplementado con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del procedimiento de aireación. Dependiendo de las características de la célula hospedadora, pueden usarse o bien microvehículos como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje o pueden adaptarse las células para cultivo en suspensión (lo que es típico). El cultivo de células hospedadoras, en particular células hospedadoras de vertebrado, puede utilizar una variedad de modos operativos tales como por lote, discontinuo alimentado, procesamiento por lote repetido (véase Drapeau y col (1994) cytotechnology 15: 103-109), procedimiento por lote extendido o cultivo en perfusión. Aunque las células hospedadoras de mamífero transformadas recombinantemente pueden cultivarse en medio que contiene suero comprendiendo dicho medio suero fetal de ternero (FCS), se prefiere que dichas células hospedadoras se cultiven en medio sintético libre de suero tal como el que se

desvela en Keen y col (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios disponibles comercialmente tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EE.UU.), suplementado en caso necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo libre de suero de células hospedadoras puede necesitar que esas células se adapten a crecer en condiciones libres de suero. Un enfoque de adaptación es cultivar dichas células hospedadoras en medio que contiene suero y cambiar repetidamente el 80 % del medio de cultivo por el medio libre de suero de tal modo que las células hospedadoras aprendan a adaptarse a las condiciones libres de suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg K y col, (1995) en *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. y col. eds), páginas 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados al medio pueden recuperarse y purificarse a partir del medio usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos requiere típicamente al menos un 95 % de pureza determinado mediante SDS-PAGE reductor, más típicamente un 98 % o 99 % de pureza, en comparación con el medio de cultivo que comprende los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los restos celulares del cultivo celular se retiran típicamente usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Como alternativa, el anticuerpo puede recogerse mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación previa. Están disponibles una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxapatita (HA), cromatografía de afinidad (incluyendo opcionalmente un sistema marcador tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad de proteína A o G seguida de etapas de cromatografía adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y/o HA, de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación por sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean varias etapas de retirada de virus (por ejemplo, nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). A continuación de estas varias etapas, se proporciona una preparación purificada (típicamente monoclonal) que comprende al menos 10 mg/ml o más, por ejemplo 100 mg/ml o más del anticuerpo de la invención y por lo tanto se forma una realización de la invención. Una concentración de 100 mg/ml o mayor puede generarse mediante ultracentrifugación. De manera adecuada, dichas preparaciones están sustancialmente libres de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos se localizan intracelularmente o en el periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles pueden extraerse y volverse a plegar para formar proteínas activas de acuerdo con los procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, véase Sánchez y col (1999) *J. Biotechnol.* 72, 13-20 y Cupit PM y col (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273-277.

## **6. Composiciones farmacéuticas**

Las preparaciones purificadas de anticuerpos de la invención (particularmente preparaciones monoclonales) como se describen anteriormente, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos como los mencionados anteriormente. Típicamente, dichas composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, inerte) como se conoce y llama en la práctica farmacéutica, véase, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª ed, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen vehículos estériles tales como suero salino, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponados con tampones adecuados para un pH dentro de un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (por ejemplo, por intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o para infusión continua están adecuadamente libres de materia en partículas visibles y puede comprender entre 0,1 ng y 100 mg de anticuerpo, típicamente entre 5 mg y 25 mg de anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas son bien conocidos para los expertos en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden entre 0,1 ng y 100 mg de anticuerpos terapéuticos de la invención en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones para su uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse (secarse por congelación) para su reconstitución antes de la administración de acuerdo con procedimientos bien conocidos o evidentes para los expertos en la técnica. En los casos en los que las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo de IgG1, puede añadirse un quelante de cobre tal como citrato (por ejemplo, citrato de sodio) o EDTA o histidina a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación de los anticuerpos de ese isotipo mediada por cobre, véase el documento EP 0 612 251.

Las dosis efectivas y pautas de tratamiento para administrar el anticuerpo de la invención se determinan generalmente de manera empírica y dependen de factores tales como la edad, peso y estado de salud del paciente y de la enfermedad o trastorno que se esté tratando. Dichos factores se encuentran dentro del ámbito del médico tratante. Una guía para seleccionar las dosis apropiadas puede encontrarse en, por ejemplo, Smith y col (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, Nueva York, pero estarán generalmente entre 1 mg y 1000 mg. En una realización, la pauta de dosificación para tratar a un paciente humano afectado con AR es de 100 mg o aproximado (es decir, de 50 mg a 200 mg) de anticuerpo de la invención (o fragmento de unión a antígeno del mismo) administrado subcutáneamente por semana o cada dos semanas. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse profilácticamente.

Dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención pueden usarse simultáneamente, de manera separada o secuencial con una cantidad efectiva de otro medicamento tal como un agente antiinflamatorio, por ejemplo, un AINE, metotrexato, bucilamina, tiomalato de sodio o uno o más de un tratamiento anti TNF-alfa tal como Enbrel™ (etanercept), Remicade™ (infliximab), Humira™ (adalimumab) y/o CDP870. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-receptor de TNF-alfa, véase Davis MW y col (2000) Ann Rheum Dis 59(Supl. 1); 41-43. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con una cantidad efectiva de un agente dirigido contra: IL-1/1L-1R (por ejemplo, Kineret™), CTLA4-Ig, IL-6 (véase Choy y col, (2002) Ann.Rheum.Dis 61(supl. 1): 54). IL-8, IL-15, VEGF, IL-17, IL-18 (véase Taylor y col (2001) Curr. Opin. Immunol. 13: 611-616), anticuerpos anti-ICAM y/o anti-CD4, agentes dirigidos contra un miembro de la familia de MMP por ejemplo, MMP-1, 2, 3 y/o 13. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con un agente que abla células conocidas por estar involucradas en procesos inflamatorios, por ejemplo, linfocitos B positivos a CD20 usando, por ejemplo, Mabthera™ (Rituximab). Otras terapias en combinación con anticuerpos de la invención incluyen terapias anti-angiogénicas tales como antagonistas de la integrina  $\alpha V\beta 3$ , Kringle 1-5 (véase Sumariwalla P y col (2003), Arthritis Res Ther 5:R32-R39), Flt-1 soluble (véase Miotla y col, (2000) Lab. Invest. 80:1195-1205), un agente anti-COX-2 o un agente anti-OSM tal como un anticuerpo anti-OSM, véase el documento WO2005/095457 al que se remite específicamente al lector. De manera conveniente, una composición farmacéutica que comprenda un kit o partes del anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo junto con dichos otros medicamentos opcionalmente junto con instrucciones para su uso también está contemplada por la presente invención. Estas combinaciones pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades/trastornos artríticos tales como artritis reumatoide.

### **7. Usos clínicos**

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en tratamientos terapéuticos de enfermedades mediadas por IL-18 como una enfermedad autoinmune. Se hace mención particular a la esclerosis múltiple, enfermedades artríticas tales como artritis reumatoide, diabetes tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y psoriasis. Un paciente humano afectado por una enfermedad que responda a la neutralización de hIL-18 (como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, EII, psoriasis) puede administrarse una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, particularmente, un anticuerpo que tenga una cadena pesada con una secuencia expuesta en SEC ID N°: 9 y una cadena pesada que tenga la secuencia expuesta en SEC ID N°: 13.

También se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una cualquiera (o más) de las enfermedades/trastornos anteriormente mencionados.

Tabla A

Descripción de la proteína o polinucleótido (PN)	Identificador de secuencia (SEC ID N°: )
CDRH1	1
CDRH2	2
CDRH3	3
CDRL1	4
CDRL2	5
CDRL3	6
IL-18 humana	7
PN de IL-18 humana	8
Cadema pesada de H1 (región variable + constante)	9
Cadena pesada de H1 (PN)	10
Región variable de H1	11
Región variable de H1 (PN)	12
Cadena ligera de L2 (región variable + constante)	13
Cadena ligera de L2 (PN)	14
Región variable de L2	15
Región variable de L2 (PN)	16

(continuación)

Descripción de la proteína o polinucleótido (PN)	Identificador de secuencia (SEC ID N°: )
Cadena pesada de H2 (variable + constante)	17
Cadena pesada de H2 (PN)	18
Región variable de H2	19
Región variable de H2 (PN)	20
Cadena pesada de H3 (variable + constante)	21
Cadena pesada de H3 (PN)	22
Región variable de H3	23
Región variable de H3 (PN)	24
Cadena ligera de L1 (región variable + constante)	25
Cadena ligera de L1 (PN)	26
Región variable de L1	27
Región variable de L1 (PN)	28
Cadena ligera de L3 (región variable + constante)	29
Cadena ligera de L3 (PN)	30
Región variable de L3	31
Región variable de L3 (PN)	32
Quimera 2c10 de rata-IgG1 humana	33
Quimera 2c10 de rata-IgG1 humana (PN)	34
Quimera 2c10 de rata-Ckappa humana	35
Quimera 2c10 de rata-Ckappa humana (PN)	36
Marco conservado aceptor de cadena pesada	37
Marco conservado aceptor de cadena ligera	38
secuencia de aminoácidos de JH6 añadida a SEC ID N°: 37	39
Secuencia de aminoácidos de Jkappa 2 añadida a SEC ID N°: 38	40

## **8. Ejemplificación**

5 Los siguientes ejemplos ilustran varios aspectos de la presente invención. Toda la tecnología de clonación, ligamiento y otras tecnologías de ADN recombinante se efectúan como se enseña generalmente en Maniatis y col, Molecular Cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, o Sambrook y col, Molecular Cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory. Los sistemas de vectores y procedimientos adicionales de biología molecular usados en el presente documento se desvelan en el documento WO2005/095457, al que se remite específicamente la lector.

### **8.1 Clonación de regiones variables de hibridoma**

10 El anticuerpo parental de rata 2C10 se expone en la Patente de los Estados Unidos 6.706.487. Se remite al lector específicamente a este documento. Se diseñó un anticuerpo quimérico 2C10c basándose en las regiones V de rata descritas anteriormente unidas a IgG1 o regiones C kappa humanas. Se introdujeron una secuencia de señal de inmunoglobulina y un codon ATG de inicio de la traducción para las construcciones de cadena ligera y pesada. Se diseñaron sitios de endonucleasas de restricción HindIII y BsiWI para enmarcar el dominio VL y permitir la clonación en los vectores de expresión en mamífero que ya contenían la región Ckappa humana (SEC ID N°: 36). Se diseñaron sitios de endonucleasas de restricción HindIII y SpeI para enmarcar el dominio VH y permitir la clonación en los vectores de expresión en mamífero que ya contenían la región C il humana (SEC ID N°: 34). Esto dio como resultado dos cambios de aminoácidos para la región Vh de 2C10 en el marco conservado 4 (restos 107 y 108 de Kabat) a partir de la secuencia publicada como se muestra en SEC ID N°: 33.

5 Se usaron oligonucleótidos solapantes para construir la secuencia codificante completa mediante PCR y clonación en los vectores de expresión indicados anteriormente. Después de la verificación de secuencias, el anticuerpo quimérico se expresó en células CHO. El anticuerpo producido se purificó a partir de sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad sobre proteína A sefarosa. Los anticuerpos quiméricos de 2C10 se evaluaron en ensayos de unión *in vitro* para demostrar la potencia comparable con 2C10 parental de rata. Esto se logró determinando los valores de CE50 para la unión a IL18 humana o de rhesus en ELISA (Figuras 16 y 17) o mediante bioensayo de inhibición de liberación de IFN- $\gamma$  en KG-1, véase Figura 15.

## 8.2 Humanización

### 8.2.1 Estrategia de humanización de la cadena ligera

10 Se seleccionó para la secuencia de cadena ligera variable de 2C10 de rata un marco conservado aceptor de línea germinal humano (F\_IGKV1D-12-1, SEC ID N°: 38) que tenía un 64 % de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia de cadena ligera variable de 2C10 de rata. La región V de línea germinal se combinó *in silico* con un FR4 adecuado, en este caso el minigén de la región J kappa 2 (Kabat, Vol. 11) basándose en la similitud de secuencia (SEC ID N°: 40). Se generaron tres variantes humanizadas basándose en la comparación de secuencias y el posible impacto en la función del anticuerpo. La construcción L1 fue un injerto directo de las CDR de rata (usando la definición de Kabat) en el marco conservado aceptor humano seleccionado anteriormente. La construcción L2 se basó en L1 con una retromutación adicional en el resto 71. La construcción L3 se basó en L2 con 4 retromutaciones adicionales en los restos 45, 83, 84 y 85. Ver Tabla 1.

**Tabla 1: Resumen de variantes VL humanizadas generadas**

<u>Construcción</u>	<u>Aceptor/Marco conservado patrón</u>	<u>Retromutaciones en nº de aa. (Kabat)</u>	<u>Número total de retromutaciones</u>	<u>Marco conservado aceptor humano</u>	<u>Secuencia original de rata</u>
<u>L1</u>	F_IGKV1D-12-1/J2 (SEC ID N°: 38)	-----	NINGUNO	-----	-----
<u>L2</u>	L1	71	1	F	Y
<u>L3</u>	L2	45	5	K	Q
		83		F	E
		84		A	G
		85		T	D

### 8.2.2 Estrategia de humanización de la cadena pesada

25 Se seleccionó para la secuencia de cadena pesada variable de 2C10 de rata un marco conservado aceptor de línea germinal humano (Fp\_IGHV1-f\_2, SEC ID N°: 37) que tenía un 59 % de identidad (incluyendo las CDR) con cadena pesada variable de 2C10 de rata. La región V de línea germinal se combinó *in silico* con un FR4 adecuado, en este caso el minigén JH6 (Kabat, Vol. II) basándose en la similitud de secuencia (SEC ID N°: 39). Se diseñaron tres variantes de cadena pesada variable humanizada basándose en este marco conservado. H1 es un injerto de las CDR de rata (usando la definición de Kabat con 4 retromutaciones adicionales en los restos 27, 28, 29 y 93. Esto permitió una secuencia de aminoácidos muy poco frecuente justo cadena arriba de CDR1 del anticuerpo parental (es decir, donante) que puede constituir una parte de la CDR (como se define por Chothia). H2 se basó en H1 con dos retromutaciones adicionales en los restos 39 y 40. H3 por su parte se basó en H2 con otras 4 retromutaciones adicionales en los restos 36, 71, 89 y 91. Ver Tabla 2.

**Tabla 2: Resumen de variantes Vh humanizadas generadas**

<u>Construcción</u>	<u>Aceptor/Marco conservado patrón</u>	<u>Retromutaciones en nº de aa. (Kabat)</u>	<u>Número total de retromutaciones</u>	<u>Marco conservado aceptor humano</u>	<u>Secuencia original de rata</u>
<u>H1</u>	Fp_IGHV1-f_2 (SEC ID N°: 37)	27 28 29 93	4	Y T L A	E I S T
<u>H2</u>	H1	39 40	6	Q A	R R

(continuación)

<b>Construcción</b>	<b>Aceptor/Marco conservado patrón</b>	<b>Retromutaciones en nº de aa. (Kabat)</b>	<b>Número total de retromutaciones</b>	<b>Marco conservado aceptor humano</b>	<b>Secuencia original de rata</b>
<b>H3</b>	H2	36	10	W	F
		71		E	A
		89		V	T
		91		Y	F

### 8.3 Humanización de 2C10c

Las regiones V humanizadas se sintetizaron desde el comienzo mediante acumulación de oligonucleótidos solapantes y amplificación mediante PCR. Los cebadores incluyeron sitios de restricción para la clonación en vectores de expresión en mamíferos y secuencias de señal de inmunoglobulina humana para la secreción. Las regiones V humanizadas se clonaron en vectores de expresión de mamífero como H1, H2 y H3 usando HindIII y SpeI en vectores de expresión de mamífero que contienen la región constante gamma 1 humana y como L1, L2 y L3 usando HindIII y BsiWI en los vectores de expresión de mamífero que contienen la región constante kappa humana. Esto generó variantes de cadena pesada humanizadas de isotipo IgG1 humana y variantes de cadena ligera humanizadas de isotipo kappa humano.

#### 8.3.1 Expresión de combinaciones de anticuerpos de cadena pesada y ligera humanizados.

Se transfectaron transitoriamente células CHOK1 en cuadruplicado. Se ensayaron los sobrenadantes para concentración de anticuerpo y a continuación se usaron en ensayos de unión *in vitro* comparando la quimera 2C10 de rata-humana.

Se efectuó expresión transitoria a mayor escala para todas las 9 variantes mezclando, para cada frasco, 51,4 ug de plásmido de cadena ligera y 8,6 ug de plásmido de cadena pesada con 240 ug de lípido de transfección (este lípido se describe en el documento WO2006/053783, ejemplo 13) en 8 ml de medio (OptiMEM/ glutamax/ FBS al 5%) y aplicando esta mezcla a dos frascos T175 prácticamente confluentes de células CHOK1 durante 72 horas en condiciones típicas de cultivo tisular. Los anticuerpos también se expresaron en un sistema de células CHO policlonal a cantidad de mg usando frascos de agitación y se purificaron usando FPLC y proteína A.

### 8.4 Ensayos de unión *in vitro*

#### 8.4.1 Análisis Biacore

Se efectuó análisis cinético Biacore™ de los anticuerpos 2C10 humanizados en un instrumento Biacore™ 3000 usando captura de proteína A de los anticuerpos en tampón HBS-EP (Biacore™). En resumen, Se inmovilizó proteína A en una microplaca CM5 mediante acoplamiento de amina primario, usando el protocolo recomendado por el fabricante, a densidades de aproximadamente 2000-4000 unidades de resonancia (UR). El anticuerpo humanizado se pasó a continuación sobre la superficie de proteína A y se capturó a niveles de aproximadamente 200-500 UR, después de un periodo de estabilización, se pasó IL18 (humana o de rhesus) sobre la superficie del anticuerpo capturado a concentraciones definidas y se obtuvieron los sensogramas de unión. La regeneración, usando condiciones de elución ácidas, dio como resultado la retirada completa del anticuerpo capturado de la superficie de proteína A, y no redujo significativamente la capacidad de unión de la superficie. Todas las curvas se referencian por duplicado contra una inyección de tampón en vez de IL18 y los datos se ajustan al modelo de unión 1:1 usando los parámetros de ajuste global en BiaEval 4.1. Los experimentos de clasificación de tasa inversa se dispusieron usando el mismo procedimiento de proteína A de captura, aunque solo se usó una sola concentración de IL18 (10 nM). Aunque los datos se ajustaron usando el mismo modelo de unión que en el análisis cinético, ya que solo se usó una concentración de analito en la tasa inversa comunicada, este valor es útil para clasificar más que proporcionar una medida cinética exacta y se usó a modo de selección de qué anticuerpos se investigarían adicionalmente.

Los resultados iniciales a 25 °C indicaron que todas las construcciones tenían afinidades de unión similares a IL18 humana que el anticuerpo parental de rata 2C10. Sin embargo, cuando se llevó a cabo un experimento de clasificación de tasa inversa a 37 °C, las construcciones de L1 mostraron poco rendimiento en comparación con las construcciones L2 y L3 con un aumento visto en las tasas inversas (Tabla 3a y 3b).

**Tabla 3a: Parámetros cinéticos para análisis Biacore de anticuerpos humanos anti-IL18 Ensayados a 25 °C.**

<b>ANTICUERPO</b>	<i>ka</i>	<i>Kd</i>	<b>KD (pM)</b>
<b>2C10c</b>	2,55e6 (7e4)	3,5e-5 (4,2e-6)	13,9 (2,2).
<b>H1L1</b>	1,4e6	4,7e-5	33,2

ANTICUERPO	<i>ka</i>	<i>Kd</i>	KD (pM)
H1L2	1,3e6 (1,4e5)	3,85e-5 (1,5e-5)	30,3 (8,7).
H1L3	1,25e6 (2,1e4)	2,8e-5 (5,7e-6)	22,5 (7,2).
H2L1	1,03e6 (1,0e5)	3,35e-5 (1,1e-5)	33,5 (13,4).
H2L2	1,4e6 (1,4e5)	2,8e-5 (0,0)	20,1 (1,8).
H2L3	1,15e6 (7e5)	2,8e-5 (2,8e-6)	23,8 (0,7).
H3L1	2,5e6 (4,2e5)	4,7e-5 (9,9e-6)	19,4 (7,6).
H3L2	2,6e6 (2,8e5)	4,3e-5 (3,6e-6)	16,5 (2,7).
H3L3	1,7e6 (4,2e5)	4,0e-5 (5,7e-6)	24,2 (9,3).

Los datos son el resultado de dos experimentos, (desviación estándar).

**Tabla 3b: Análisis Biacore de clasificación de tasa inversa de unión de IL18 humana a anticuerpos Anti-IL18 humanizados capturados por proteína A. Ensayados a 37 °C.**

ANTICUERPO	<i>kd</i>
2C10c	7,01E-5
H1L1	1,62E-4
H1L2	4,1e-5
H1L3	5,54e-5
H2L1	9,93E-5
H2L2	4,15E-5
H2L3	4,62E-5
H3L1	1,3E-4
H3L2	8,22E-5
H3L3	7,01E-5

Los datos son el resultado un experimento

- Además de mostrar un rendimiento bajo a 37 °C, las construcciones de L1 también fueron peores en lo referente a afinidad por la unión a IL18 de rhesus (Tabla 4a) a 25 °C. Basándose en estas observaciones, los anticuerpos seleccionados se investigaron en más detalle para la unión a IL18 de humano y de rhesus a 37 °C. Los datos mostrados en la Tabla 4b para IL-18 humana son la media (y desviación estándar) de seis determinaciones separadas. Los datos para IL-18 de rhesus muestran la media y desviación estándar de dos experimentos para H1L2 y H1L3, mientras que los datos para H3L2 y H3L3 son de un solo experimento. Las desviaciones estándar comparativamente elevadas de estos datos son posiblemente el resultado de llevar a cabo este experimento a 37 °C.
- El hecho de que las construcciones de L1 rindiesen relativamente poco es sorprendente cuando se considera que la diferencia entre la construcción de L1 y L2 es la sustitución de una fenilalanina por una retromutación de tirosina en la posición 71 de la cadena ligera. Tanto tirosina como fenilalanina son por supuesto aminoácidos aromáticos, por lo que el hecho de que un cambio tan sutil en la estructura del marco conservado diese lugar a resultados marcados (en cuanto a afinidad de unión) observados en el sistema Biacore™ a 37 °C (pero no a 25 °C) fue inesperado.

**Tabla 4a: Parámetros cinéticos para análisis Biacore de unión de IL18 de rhesus a construcciones de anticuerpos humanizados ensayados a 25 °C.**

ANTICUERPO	<i>ka</i>	<i>kd</i>	KD (pM)
2C10c	1,2E6	6,6E-5	54,7
H1L1	4,3E5	1,6E-4	380

ANTICUERPO	$k_a$	$k_d$	KD (pM)
H1L2	4,3E5	4,7E-5	108
H1L3	5,8E5	6,4E-5	109
H2L1	2,9E5	1,8E-4	627
H2L2	5,3E5	5,5E-5	104
H2L3	4,7E5	8,8-5	189
H3L1	9,1E5	1,4E-4	149
H3L2	1,1E6	6,6E-5	59,6
H3L3	1,0E6	7,0E-5	69,1

Los datos son el resultado un experimento.

**Tabla 4b: Parámetros cinéticos para análisis Biacore de unión de IL18 humana y de rhesus a construcciones de anticuerpos humanizados ensayados a 37 °C.**

Anticuerpo/IL18	$k_a$	$K_d$	KD (pM)
<b>H1L2</b>			
IL18 humana	7,75e5 (2,9e4)	1,38e-4 (1,7e-5)	197 (66,3).
IL18 de Rhesus	1,01 e6 (9,2e5)	1,40e-4 (2,1e-5)	139 (8,5).
<b>H1L3</b>			
IL18 humana	7,12e5 (2,5e4)	1,18e-4 (1,9e-5)	188 (81).
IL18 de Rhesus	1,08e6 (2,2e5)	1,86e-4 (6,1e-5)	170 (21,9).
<b>H3L2</b>			
IL18 humana	1,52e6 (4,9e5)	1,45e-4 (2,2e-5)	105 (39,6).
IL18 de Rhesus	1,85e6	1,19e-4	64,3
<b>H3L3</b>			
IL18 humana	1,49e6 (4,5e5)	1,52e-4 (1,7e-5)	110 (36,1).
IL18 de Rhesus	1,79e6	1,35e-4	75,6

Las variantes H1L1, H1L2 y H1L3 se seleccionaron para análisis adicionales en la sección 8.4.2 a continuación.

#### 8.4.2 Datos de análisis Biacore T100

- 5 La caracterización de determinadas variantes de anticuerpo se llevó a cabo adicionalmente usando una máquina Biacore™ T100. Esta máquina ofrece ventajas frente a Biacore™ 3000, en cuanto a sensibilidad, control de temperatura y estabilidad al comienzo a temperaturas mayores debido al uso de un desgasificador en línea que minimiza los efectos de tampón a temperaturas mayores. También ofrece software mejorado como análisis automático de datos.
- 10 La metodología fue básicamente la misma que para el procedimiento usado en la sección 8.4.1 anterior: La proteína A se inmovilizó en una microplaca CM5 a densidades de entre 2000-6000 UR mediante acoplamiento de amina primario. Los pases se llevaron a cabo en HBS-EP (Biacore™). Los anticuerpos anti-IL18 se capturaron a densidades de entre 100-500 UR, la IL-18 humana se pasó sobre su superficie de captura a concentraciones de entre 16-0,0625 nM, con la concentración de OnM (es decir, de solo tampón para el anticuerpo capturado= usada como doble referencia. La regeneración después de cada inyección de IL18 fue mediante elución ácida suave usando dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 1,5. Esta etapa de regeneración retiró el anticuerpo capturado de la superficie de proteína A (y por lo tanto, el anticuerpo IL18 unido a esta). La regeneración no alteró significativamente la capacidad de la superficie de proteína A de unirse a pulsos posteriores de anticuerpo, permitiendo que sucediese otro evento de captura. Las curvas de unión obtenidas se analizaron usando el programa informático de análisis propio de la máquina T100 usando el modelo de unión 1:1. Los pases se efectuaron a las temperaturas indicadas.
- 15
- 20

#### **Análisis de unión de H1L1 y H1L2 a 15 °C, 20 °C, 25 °C, 32 °C y 37 °C**

El experimento se llevó a cabo usando el procedimiento anterior a varias temperaturas. La Figura 1 muestra el efecto



de la temperatura en la tasa directa (ka), mientras que la Figura 2 muestra el efecto sobre la tasa inversa (kd) y la Figura 3 el efecto en la constante de equilibrio (KD). La Tabla 5 detalla los valores cinéticos usados para crear estas figuras.

**Tabla 5: Parámetros cinéticos del experimento de variación de temperatura.**

Temp. °C	Anticuerpo	Ka	Kd	KD (pM)
15	H1L1	1,49e6	2,98e-5	20,1
	H1L2	2,07e6	2,07e-5	10,0
20	H1L1	2,02e6	4,77e-5	23,7
	H1L2	2,84e6	2,53e-5	8,9
25	H1L1	2,52e6	7,82e-5	31,1
	H1L2	3,37e6	4,22e-5	12,5
32	H1L1	3,48e6	1,64e-4	47,2
	H1L2	4,51e6	8,57e-5	18,9
37	H1L1	6,30e6	3,36e-4	53,3
	H1L2	5,85e6	1,31e-4	22,3
Los datos son de un único experimento.				

- 5 Los datos muestran que las tasas directas de los dos anticuerpos ensayados son similares en el intervalo de temperaturas ensayado, con H1L2 teniendo generalmente una tasa directa más rápida hasta el valor final de 37 °C, cuando H1L2 tiene una tasa directa más rápida. Sin embargo, se ve una diferencia mayor cuando se observan las tasas inversas, los dos anticuerpos tienen tasas inversas similares a 15 °C, 20 °C, 25 °C, pero comienzan a divergir a 32 °C y 37 °C, viéndose la tasa inversa más alta para H1L1. Estos cambios se reflejan generalmente en la constante de equilibrio general (que es una función de kd/ka), e indican que la diferencia entre H1L1 y H1L2 está principalmente en la estabilidad del complejo anticuerpo/IL18 como se define mediante la tasa inversa (kd).

**Análisis de unión de H1L1, H1L2, H1L3 y 2C10 quimérico a 25 °C y 37 °C**

- 15 Los experimentos se llevaron a cabo como se describe anteriormente. La Tabla 6 detalla los parámetros cinéticos obtenidos. Los datos muestran que H1L2 es un mejor anticuerpo que H1L1 en cuanto a unión como se define mediante la constante de equilibrio KD tanto a 25 °C como a 37 °C, pero los parámetros cinéticos muestran que a 25 °C, H1L2 tiene una mejor tasa directa (ka) que H1L1. A 37 °C, se invierte la posición indicando que la unión superior vista a 37 °C por H1L2 se debe más a la tasa inversa (kd), lo que indica que la mutación que diferencia L2 de L1 otorga una estabilidad aumentada del complejo IL18-anticuerpo a mayores temperaturas.

**Tabla 6: Cinética de unión de H1L1, H1L2, H1L3 y 2C10 quimérico a IL18 humana a 25 °C y 37 °C**

<i>IL18 humana a 25 °C</i>				<i>IL18 humana a 37 °C</i>			
Anticuerpo	Ka	Kd	KD (pM)	Anticuerpo	Ka	Kd	KD (pM)
H1L1 (n=4)	2,49e6 (4,41e5)	7,94e-5 (1,02e-5)	33,1 (9,3).	H1L1 (n=6)	5,64e6 (2,42e6)	4,58e-4 (1,02e-4)	94,3 (39,6).
H1L2 (n=4)	2,88e6 (7,39e5)	4,32e-5 (9,75e-6)	16,3 (7,0).	H1L2 (n=6)	4,86e6 (1,88e6)	1,98e-4 (5,20e-5)	46,0 (18,8).
H1L3 (n=3)	2,6e6 (9,9e5)	4,3e-5 (7,6e-6)	22,0 (9,9).	H1L3 (n=3)	6,3e6 (6,0e6)	2,1 e-4 (4,4e-5)	64,8 (57,3).
Quimera 2C10 (n=3)	6,88e6 (3,22e6)	5,22e-5 (8,94e-5)	9,1 (4,7).	Quimera 2C10 (n=2)	2,55e7 (1,25e7)	5,62e-4 (1,97e-4)	22,9 (3,5).

- 20 Los datos son la media de un número de conjuntos de datos separados (n), se muestran la media y la desviación estándar, con la desviación estándar entre paréntesis. Los valores para los pases a 25 °C y 37 °C para H1L1 y H1L2 obtenidos del análisis a cinco temperaturas distintas se incluyen en este conjunto de datos.

7.4.3 Evaluación de variantes humanizadas de 2C10c en ELISA de unión de IL18

5 Se llevó a cabo ELISA con todas las nueve variantes humanizadas al menos 6 veces usando varios lotes de preparación de anticuerpo purificado. Las Figuras 4A-4C muestran datos representativos de un experimento que generó la clasificación de valores de CE50 ilustrados en la Tabla 7; Se inmovilizó IL-18 humana en placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp usando 2,5 ug/ml de 16D10 (anticuerpo monoclonal de ratón no neutralizante) para capturar 5 ng/ml de IL-18 humana recombinante. Se añadieron anticuerpos humanizados anti-IL-18 a varias diluciones. Los anticuerpos humanizados unidos se detectaron usando conjugado Fc anti-IgG humana-peroxidasa específica (Sigma A0170).

**Tabla 7: Aumento de valores de CE50 de variantes humanizadas de 2C10** (expresado en [µg/ml])

	2C10c	H3L2	H3L3	H1L1	H1L2	H1L3	H2L2	H3L1	H2L3	H2L1
<b>CE50*</b>	0,007	0,008	0,009	0,010	0,011	0,011	0,012	0,013	0,016	0,021
*Todos los EE estuvieron entre 0,001 y 0,002										

10 La potencia de todas las variantes pareció ser muy próxima a la de la quimera 2C10, lo que sugiere que la humanización dio como resultado una pérdida muy pequeña de potencia. Aunque los valores de CE50 generados mediante varias repeticiones de los ensayos generó una clasificación de variantes, ELISA individualmente no permitió una distinción clara entre estas variantes (véanse Tabla 7 y Figuras 4A-4C). Se logró una cierta distinción de variantes usando Biacore™ (secciones 8.4.1 y 8.4.2) que dieron como resultado que se evaluaran solo 4 variantes en varios experimentos repetidos independientes usando IL18 de humano y de rhesus (Tabla 8, Figura 5 [humano] y 6 [rhesus]).

15 **Tabla 8: Valores de CE50 de seis experimentos independientes repetidos con cuatro variantes humanizadas seleccionadas para unión a IL18 humana.**

	Exp. 1/1	Exp. 1/2	Exp. 2/1	Exp. 2/2	Exp. 3/1	Exp. 3/2	Media	EE
<b>2C10c</b>	0,015	0,016	0,013	0,011	0,020	0,020	0,0158	0,004
<b>H1L2</b>	0,029	0,030	0,021	0,025	0,024	0,027	0,0260	0,003
<b>H1L3</b>	0,027	0,025	0,029	0,028	0,029	0,027	0,0275	0,002
<b>H3L2</b>	0,032	0,030	0,026	0,018	0,025	0,022	0,0255	0,005
<b>H3L3</b>	0,035	0,028	0,018	0,021	0,025	0,025	0,0253	0,006

8.4.4. Evaluación de variantes H1 humanizadas de 2C10 en ELISA de unión a IL-18

20 Se llevó a cabo ELISA con tres variantes de H1 humanizadas: H1L1 H1L2 y H1L3 para determinar la unión a IL-18 humana a temperatura ambiente y a 37 °C tanto en suero humano como en solución de bloqueo (PBS al 0,05 % TWEEN con 1 % de BSA (p/v)). Las variantes de anticuerpo humanizado se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp a 2,5 µg/ml. La captura de 5 ng/ml de IL-18 humana recombinante se llevó a cabo bien a temperatura ambiente o a 37 °C en suero humano o solución de bloqueo. Se añadió anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-18 16D10. El anticuerpo de ratón unido se detectó usando conjugado kappa anti-ratón-peroxidasa (Serotec MCA 1291P). Los valores representativos de CE50 generados a partir del estudio se ilustran en la Tabla 9.

25 **Tabla 9 - Valores de CE50 de variantes H1 humanizadas de 2C10 a temperatura ambiente y a 37 °C**

	CE50 (ng/ml)	Error estándar
<b>Incubaciones a temperatura ambiente en presencia de suero</b>		
Quimera 2C10	7,296	0,358
H1L1	10,189	0,512
H1L2	9,791	0,471
H1L3	8,989	0,411

(continuación)

	CE50 (ng/ml)	Error estándar
<b>Incubaciones a temperatura ambiente</b>		
<b>En tampón de bloqueo:</b>		
Quimera 2C10	3,814	0,068
H1L1	3,315	0,136
H1L2	3,552	0,079
H1L3	3,790	0,133
<b>Incubaciones a 37 °C</b>		
<b>en presencia de suero</b>		
Quimera 2C10	10,140	1,254
H1L1	12,069	0,740
H1L2	9,791	0,471
H1L3	11,438	1,861
<b>En tampón de bloqueo:</b>		
Quimera 2C10	3,794	0,114
H1L1	3,430	0,104
H1L2	3,404	0,145
H1L3	3,334	0,222

La potencia de las tres variantes H1 humanizadas no se ve afectada por el cambio de temperatura a la que la etapa de unión de IL-18 humana se efectúa, desde temperatura ambiente hasta 37 °C en este ensayo. Se observan menores señales de unión cuando los anticuerpos están presentes en suero humano.

#### 5 8.4.5 Evaluación de la estabilidad de anticuerpos de la variante H1 humanizada a 37 C

La estabilidad de almacenamiento de tres variantes de H1 humanizadas, H1L1 H1L2 y H1L3 se determinó durante un periodo de tiempo de 14 días a 37 °C tanto en suero humano como en suero salino tamponado con fosfato. Los anticuerpos se diluyeron a 50 mg/ml, la estabilidad se determinó mediante ELISA de unión a IL-18 después de periodos de incubación de 0, 1, 4, 6, 8, y 14 días. Para el ELISA de unión a IL-18, se inmovilizó 16D10 (anticuerpo monoclonal de ratón no neutralizante) sobre placas Nunc Maxisorp para capturar 5 ng/ml de IL-18 humana recombinante. Se añadieron los anticuerpos humanizados anti-IL-18 muestreados en distintos momentos durante el transcurso de la incubación a 37 °C. Los anticuerpos humanizados unidos se detectaron usando conjugado Fc anti-IgG humana-peroxidasa específica.

La exposición prolongada a temperatura de 37 °C durante 0, 1, 4, 6, 8 y 14 días no afectó a la potencia de unión de las variantes de anticuerpo H1 humanizadas en base a su capacidad de unirse a IL-18 humana en este formato de ensayo.

#### 8.5 Unión de H1L2 a IL18 humana en presencia de fluido sinovial

Se llevó a cabo un ELISA en el que fluido sinovial humano al 50 % se enriqueció con IL18 humana recombinante en el intervalo de 500 ng/ml a 0 ng/ml. La IL-18 contenida en esta solución se aplicó a pocillos de una placa de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) recubierta con el anticuerpo H1L2. IL-18 unida se detectó a continuación mediante un anticuerpo anti-IL-18 biotinilado (D045-6, MBL) y estreptavidina-HRP. La titulación de IL-18 humana recombinante en fluido sinovial (SH) al 50 % produjo prácticamente la misma curva que la titulación de IL-18 humana recombinante en tampón con solo una pequeña desviación en el valor medio máximo. Véase Figura 7. Esto demuestra la capacidad del anticuerpo de unirse a hIL-18 incluso en presencia de SF humano al 50 % lo que se asemeja más al ambiente de unión que se encontrará el anticuerpo en una configuración terapéutica.

##### 8.5.1 Unión a IL18 en presencia de proteína de unión a IL18 (IL18pu)

Se usó tecnología Biacore™ (Biacore™ 3000) y ELISA para determinar si H1L2 puede todavía unirse a IL18 en presencia de IL18bp humana. IL18bp tiene gran afinidad por IL18 y actúa como un inhibidor natural de la función de

IL-18 (Figura 8, Figura 9A y B, Tabla 10 y Tabla 11).

### Análisis mediante Biacore

5 En resumen, Se inmovilizó proteína A en una microplaca CM5 a una densidad superficial de aproximadamente 4000 unidades de resonancia (UR) mediante acoplamiento de amina primario. A continuación se pasó proteína recombinante de unión a Fc-IL18 (R&D Systems) a una concentración de 3 µg/ml y a un caudal de 10 µl/minuto durante un minuto; esto dio como resultado la captura de 1400 UR de proteína de unión a IL18. Se pasó a continuación IL18 sobre la superficie de proteína de unión a IL18 capturada a una concentración de 30 nM, a un caudal de 10 µl/minuto durante 5 minutos. Después de esto, se pasó el anticuerpo parental 2C10 de rata a una concentración de 10 nM sobre la superficie de proteína de unión a IL18/IL18 durante 3 minutos a un caudal de 30 µl/minuto durante 3 minutos. En caso de que el epítipo reconocido por el anticuerpo 2C10 sobre IL18 interfiera con el sitio de interacción para la proteína de unión a IL18, no debería observarse señal de unión. La Figura 10 demuestra que 2C10 está unido a hIL-18 que, a su vez, ha sido capturada por hIL-18PU, lo que indica que los sitios de unión para 2C10 y hIL18PU no son solapantes.

**Tabla 10: efecto de IL-18PU en la secreción de IFN-γ en células sinoviales de artritis reumatoide (AR)**

Muestra, IL-18pu	Estado	Control	IL-12	IL-18	IL-12 + IL-18
<b>RA1</b>	-	ND	0,63	ND	1,63
	+	ND	0,29	ND	0,13
<b>RA2</b>	-	ND	0,85	ND	0,70
	+	ND	0,10	ND	0,10
<b>RA3</b>	-	ND	1,06	ND	1,62
	+	ND	0,32	ND	0,40

15 Kawashima, M. y Miossec, P., Arthritis & Rheumatism, Vol. 48 N° 3 (Marzo 2003), págs. 631-637

### Análisis mediante ELISA

20 La unión de H1L2 humanizada o AcM de rata 2C10 a IL18 humana unida a IL18pu capturada se ensayó en ELISA de unión directa en los que la proteína de fusión IL18pu-Fc humana recombinante (R&D Systems, N°: 119-BP) recubrió sobre placas Nunc Maxisorp a 0,5 µg/ml. Se añadió IL18 humana recombinante (reactivo propio) a 100 ng/ml en tampón de bloqueo (PBS que contiene un 1 % p/v de BSA). Los anticuerpos purificados se añadieron a concentraciones en el intervalo de 0,5 ng/ml a 1 µg/ml. El anticuerpo unido se detectó con conjugado cadena ligera kappa anti-humano-HRP específico (Sigma) o HRP anti-IgG de rata. Las Figuras 18A y B ilustran los resultados obtenidos.

#### 8.6 Bioensayo *in vitro*

25 8.6.1 Actividad de construcciones humanizadas en la neutralización de la liberación de IFN-γ estimulada por IL18 en línea celular KG-1

Este ensayo mide la actividad neutralizante de anticuerpo específico para IL-18 y se basa en la inducción mediada por IL-18 de IFN-γ en células KG-1. KG-1 (ATCC N° CCL-246) es una línea celular mielomonocítica que expresa constitutivamente receptor de IL-18 funcional y, por lo tanto, responde a estimulación por IL-18 exógena.

30 Se determinaron todas las 9 nueve variantes para su capacidad de inhibir la liberación de IFN-γ estimulada por IL18 humana en células KG-1 (Tabla 12 y Figura 11).

**Tabla 12: Valores de CI50 para neutralización de IL18 humana recombinante en bioensayo de KG-1 usando las nueve variantes humanizadas.**

Anticuerpo	CI50
H1L1	0,071
H1L2	0,033
H1L3	0,027
H2L1	0,145
H2L2	0,054

(continuación)

Anticuerpo	CI50
H2L3	0,046
H3L1	0,027
H3L2	0,035
H3L3	0,034
2C10(1)	0,042
2C10(2)	0,039

5 Se llevaron a cabo al menos 6 experimentos repetidos sobre cuatro variantes humanizadas preferidas que habían mostrado la mejor afinidad a IL18 humana y de rhesus recombinante en base a análisis Biacore™. La Figura 8 ilustra un resultado representativo para las cuatro variantes humanizadas preferidas y para H1L1, y la Tabla 13 resume los resultados de estos ensayos, todos llevados a cabo con el mismo material de lote de proteína derivado a partir de células CHOe1a.

**Tabla 13: Valores de CI50 para neutralización de IL18 humana recombinante en bioensayo de KG-1 usando 4 o 5 variantes humanizadas seleccionadas.**

	Media de CI50 de 2C10	(H1L1)	(H1L2)	(H1L3)	(H3L2)	(H3L3)	IL-18 pu
Expt. 1	0,046	n.d.	0,062	0,064	0,064	0,057	n.d.
Expt. 2	sin ajuste	n.d.	sin ajuste	sin ajuste	sin ajuste	sin ajuste	n.d.
Expt. 3 Placa 1	0,074	n.d.	0,109	0,144	0,090	0,091	n.d.
Expt. 3 Placa 2	0,075	n.d.	0,173	0,156	0,128	0,115	n.d.
Expt. 4	0,017	0,091	0,017	0,044	sin ajuste	0,016	sin ajuste
Expt. 5 (Est. CE80)	0,075	0,757	0,122	0,085	0,072	0,056	0,054
Expt. 5 (Est. CE50)	0,044	0,180	0,047	0,046	0,039	0,038	0,034
Expt. 6 (Est. CE80)	sin ajuste	0,078	0,023	0,021	sin ajuste	0,013	0,007
Expt. 6 (Est. CE50)	0,020	0,069	0,019	0,019	0,015	0,016	0,01

10 En los casos donde se comparó H1L1 con otras variantes humanizadas, H1L1 demostró menor potencia en comparación con las otras cuatro construcciones humanizadas ensayadas y también en comparación con el AcM parental 2C10.

15 Se efectuaron análisis adicionales con los cuatro anticuerpos monoclonales preferidos, que se compararon para su capacidad de inhibir la liberación de IFN- $\gamma$  estimulada por IL-18 por células KG-1: 2C10 y las variantes humanizadas derivadas de 2C10 (H1L1, H1L2 y H1L3). En bioensayo de KG-1 se llevó a cabo en placas de 96 pocillos incubando 50 ng/ml de IL-18 humana recombinante y varias concentraciones de los anticuerpos específicos para IL18 (en el intervalo de 2  $\mu$ g/ml a 7,8 ng/ml, en diluciones dobles) o un isotipo de control negativo (Synagis, anticuerpo anti-VSR) durante 1 hora a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, seguido de la adición de 3,10<sup>5</sup> células KG-1 por pocillo. Las placas se incubaron finalmente durante 20-24 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Se recogió el sobrenadante y se determinó la producción de IFN usando un kit ELISA de IFN humano comercial (Biosource AHC4432; AHC4539).

20 Se efectuaron tres experimentos. Los resultados para la inhibición de la producción de IFN estimulada por IL-18 se normalizaron al control negativo. El análisis estadístico pretendía obtener una estimación de CI50 para cada AcM en cada experimento seguido de ajuste para cualquier respuesta de Synagis. Los estimados de CI50 se analizaron estadísticamente para producir una estimación general del CI50 para cada AcM con un intervalo de confianza del 95 % (es decir, intervalo estadísticamente plausible). Cada variante humanizada se comparó finalmente de nuevo con 2C10

usando el test de Dunnett.

La Figura 12 ilustra un experimento representativo. La Tabla 14 y la Figura 13 muestran una estimación general de CI50 para cada anticuerpo monoclonal con un intervalo de confianza del 95 % y un cambio % de 2C10 de rata con valores de p e intervalos de confianza.

5 **Tabla 14: Valores de CI50 para la neutralización de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por IL18 en bioensayo de KG-1**

Anticuerpo monoclonal	CI50 media $\mu\text{g/ml}$ (95 % IC)	% de cambio frente a 2C10 (95 % IC)	Valor de p de Dunnett
2C10	0,095 (0,071;0,127)		
H1L1	0,352 (0,264;0,470)	269,4 (117,2;528,2)	0,0001
H1L2	0,154 (0,112;0,211)	61,5 (-7,6;182,0)	0,0968
H1L3	0,164 (0,121;0,221)	71,6 (-0,4;195,8)	0,0519

H1L1 es de manera estadísticamente significativa menos potente que 2C10 ( $p < 0,001$ ). Las otras variantes humanizadas no son significativamente distintas de 2C10, aunque la comparación para H1L3 frente a 2C10 está en el límite.

#### 8.6.2 Actividad de H1L2 en la neutralización de la liberación de IFN- $\gamma$ en PBMC humanas estimuladas

10 Se estimularon PBMC humanas de tres donantes con IL18 humana recombinante y anticuerpo anti-CD3 y se estudió el efecto de la adición de una serie de diluciones de las cuatro variantes de anticuerpo humanizado seleccionadas. Para cada anticuerpo se incluyeron 2C10 donante parental e IL18pu para comparación. Para dos de los tres donantes, la estimulación con IL18 y anti-CD3 no produjo resultados y no se detectó IFN- $\gamma$ . Para los demás, los resultados de donante fueron muy variables a bajas concentraciones, pero se pudo lograr una inhibición completa de la producción de IFN- $\gamma$  inducida por IL18 añadiendo varios anticuerpos anti-IL18 incluyendo variantes humanizadas. Véase Figura 14.

15 También se efectuaron los experimentos en PBMC humanas estimuladas con LPS que dieron como resultado la producción de IL18 y la liberación de IFN- $\gamma$  asociada. La producción de IFN- $\gamma$  se indujo mediante LPS de modo dependiente de concentración y añadiendo anticuerpo monoclonal parental 2C10 a una concentración fija de 1  $\mu\text{g/ml}$  se inhibió completamente esta estimulación, lo que indica que el efecto está mediado por IL18 y que puede neutralizarse la IL18 endógena (datos no mostrados). Esto también puede demostrarse en sangre completa, pero el efecto de inhibición con 2C10, aunque sea dependiente de la dosis, fue menos evidente (datos no mostrados). La Figura 9 ilustra los resultados de un experimento con 3 donantes independientes e inhibición con 2C10 monoclonal parental de rata, H1L2 e IL18pu. Los donantes 1 y 3 proporcionaron resultados similares, mientras que el donante 2 no mostró liberación de IFN- $\gamma$  en la estimulación con LPS (no mostrado). La liberación de IFN- $\gamma$  mediada por IL18 puede inhibirse por completo en presencia de suero humano al 10 % o al 25 % añadiendo > 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo o IL18pu. La inhibición ya puede observarse a 10 ng/ml y mayor, y los valores de CI50 para esta inhibición en presencia de suero humano al 10 % o 25 % se muestran en la Tabla 11.

25 **Tabla 11: Valores de CI50 para la inhibición de la liberación de IFN- $\gamma$  estimulada por LPS causada por neutralización de IL18 endógena usando 2C10, H1L2, o IL18pu en presencia de suero humano**

	IL18pu	H1L2	2C10
Donante 1 suero al 10 %	0,024	0,102	0,023
Donante 1 suero al 25%	0,064	0,113	0,069
Donante 3 suero al 10 %	0,032	0,042	0,033
Donante 3 suero al 25%	0,046	0,108	0,086

#### 8.6.3 Sumario de unión a ortólogos de IL18

30 La unión de anticuerpo con IL18 de otras especies se examinó usando ELISA y Biacore y también bioensayo en células KG-1. Esto se llevó a cabo inicialmente usando 2C10 parental y 2C10c quimérico para IL18 de rhesus/cynomolgus pero se repitió con algunas de las variantes humanizadas. 2C10 parental se ensayó para unión a IL18 de cerdo, ratón y rata y las 4 mejores variantes humanizadas se ensayaron para unión a IL18 de rhesus/cynomolgus y de perro usando Biacore y ELISA, el bioensayo de KG-1 se llevó a cabo con IL18 de rhesus/cynomolgus y tres anticuerpos monoclonales. 2C10 quimérico y representativamente para las variantes humanizadas, H3L3. Dada la similitud de todas las variantes humanizadas, es posible que sea representativo para

otras variantes generadas, incluyendo H1L2 (véase Tabla 15, Figura 8).

**Tabla 15: Visión de conjunto de unión de ortólogo de AcM de rata parental 2C10, quimera 2C10c de rata-humano y grupo seleccionado de 4 variantes humanizadas**

	IL18 de rhesus/cynomolgus	IL18 de perro	IL18 de ratón y rata	IL18 de cerdo
<b>AcM 2C10 de rata</b>	ELISA (+) KG-1 (+)	ELISA (-)	ND	ND
<b>2C10 quimérico (rata/humano)</b>	ELISA (+) KG-1 (+) Biacore™ (+)	ELISA (-) Biacore™ (-)	ELISA (-) Biacore™ (-)	ELISA (-) Biacore™ (-)
<b>Humanizado (H1L2, H1L3, H3L1, H3L3)</b>	ELISA (+) KG-1 (+) <b>solo ensayado H3L3</b> Biacore™ {+}	ELISA (-)	ELISA (-)	ELISA (-)
ND no determinado; + unión detectable				

**8.7 Estudios de dicroísmo circular y desnaturalización térmica de anticuerpos de IL18**

5 Se usaron estudios de dicroísmo circular (DC) para estudiar los cambios en la estructura secundaria de los anticuerpos de IL18 en función de la temperatura, especialmente de 25 °C a 37 °C. Los estudios de desnaturalización térmica de estos mismos anticuerpos se llevaron a cabo para determinar su estabilidad térmica y sus temperaturas de fusión (Tf).

10 Procedimiento de DC: Se adquirieron los espectros de DC en un espectrómetro Applied Photophysisc Chirascan que escanea de 180 nm a 280 nm en pasos de 0,5 nm y un ancho de banda de 1 nm. El tiempo de adquisición por punto fue de 5 s. Las muestras se diluyeron a - 0,2 mg/ml en PBS y se colocaron en una celda de paso de luz de 1 mm. Se tomaron los espectros para cada proteína con el baño termostático a 4 °C, 25 °C y 37 °C. Las temperaturas reales de la muestra se determinaron mediante una sonda situada entre el cuerpo del líquido entre la celda y fueron de aproximadamente ~ 3°C de la temperatura configurada.

15 Procedimiento de Tf: Todas las proteínas se diluyeron a 0,2 mg/ml en naranja Sypro en solución de suero salino tamponado con fosfato (PBS) 1:1000. La emisión de fluorescencia se midió a 620 nm (excitación a 490 nm) usando un instrumento Bioneer Exicycler a cada intervalo de 0,5 °C mientras que la temperatura de la muestra se aumentó de 10 °C a 95 °C esperando 10 segundos en cada punto de temperatura. Las curvas de desnaturalización se ajustaron a un patrón isoterma de fusión usando Grafit.

20 Como se esperaba, la comparación de la forma de los espectros de DC para los cuatro anticuerpos mostró que su estructura era elevadamente beta lámina y esencialmente de la misma arquitectura. En el intervalo de temperatura de 4 °C-37 °C los tres anticuerpos:

- H1L1
- H1L2
- H1L3

25 no mostraron cambios significativos en su estructura secundaria, como se reveló mediante DC. Sin embargo, el anticuerpo quimérico 2C10 mostró una ligera disminución estructural en este intervalo de temperatura. Esto es coherente con la tendencia de estabilidad térmica proporcionada en la Tabla 16 a continuación.

Tabla 16: Desnaturalización térmica de anticuerpos de IL18

Anticuerpo	H1L1	H1L2	H1L3	Quimera
<b>Tf</b>	73 °C	70 °C	67 °C	65 °C
Tf = temperatura de desnaturalización/fusión				

30 H1L1, H1L2 y H1L3 son claramente estables más allá de 37 °C sin signos de cualquier desnaturalización a temperatura corporal. Su diferencia de estabilidad térmica es improbable por lo tanto que confiera ventajas diferenciales a temperaturas corporales normales y ambientes.

**SECUENCIAS**

SEC ID N°: 1

GYYPH

SEC ID N°: 2

5 RIDPEDDSTKYAERFKD

SEC ID N°: 3

WRIYRDSSGRPFYVMDA

SEC ID N°: 4

LASEDIYTYLT

10 SEC ID N°: 5

GANKLQD

SEC ID N°: 6

LQGSKFPLT

SEC ID N°: 7

15 MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDFGKLESKLSVIRNLNDQVLF  
IDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCEN  
KIIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFK  
LILKKEDELGDRSIMFTVQNE

SEC ID N°: 8

ATGGCTGCTGAACCAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTGGCAATGAAATTTATT  
GACAATACGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGGAATCAGACTTTT  
GGCAAGCTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTTGAATGACCAAGTTCTCTTC  
ATTGACCAAGGAAATCGGCCTCTATTTGAAGATATGACTGATTCTGACTGTAGAGAT  
AATGCACCCCGGACCATATTTATTATAAGTATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGT  
ATGGCTGTAACCTATCTCTGTGAAGTGTGAGAAAATTTCAACTCTCTCCTGTGAGAAC  
AAAATTATTTCTTTAAGGAAATGAATCCTCCTGATAACATCAAGGATACAAAAAGT  
GACATCATATTCTTTTCAGAGAAGTGTCCCAGGACATGATAATAAGATGCAATTTGAA  
TCTTCATCATACGAAGGATACTTTCTAGCTTGTGAAAAAGAGAGAGACCTTTTTAAA  
CTCATTTTGAAAAAGAGGATGAATTGGGGGATAGATCTATAATGTTCACTGTTCAA  
AACGAAGACTAG



SEC ID N°: 9

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMD  
AWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N°: 10

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTCAAG  
GTGTCCTGTAAGGTGTCCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTACTTCCACTGGGTGAGG  
CAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGAATCGACCCGAGGACGACAGC  
ACCAAGTACGCCGAGCGGTTCAAGGACAGGGTGACCATGACCGAGGACACCAGCACC  
GATACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTAC  
TGTACCACCTGGCGGATCTACAGAGACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGAT  
GCCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGC  
GTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC  
TGCTTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCC  
CTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC  
CTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGT

AACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGC  
TGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCC  
AGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCC  
GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAAC  
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAG  
TACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTGGCTG  
AACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAG  
AAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCC  
CCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGC  
TTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC  
TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAG  
CTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACCTGCTCCGTGATG  
CACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG  
TGA

SEC ID N°: 11

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMD  
AWGQGTLVTVSS

SEC ID N°: 12

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTCAAG  
GTGTCCTGTAAGGTGTCCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTACTTCCACTGGGTGAGG  
CAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGAATCGACCCCGAGGACGACAGC  
ACCAAGTACGCCGAGCGGTTCAAGGACAGGGTGACCATGACCGAGGACACCAGCACC  
GATACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTAC  
TGTACCACCTGGCGGATCTACAGAGACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGAT  
GCCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

5

SEC ID N°: 13

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASEDIYTYLTWYQQKPKAPKLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCLOGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS  
VFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N°: 14

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTG  
ACCATCACCTGCCTGGCCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGACCTGGTATCAGCAG  
AAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAACAAGCTGCAGGACGGC  
GTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGC  
AGCCTGCAGCCTGAGGATTTCCGCCACTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCC  
CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGC  
GTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG  
TGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAT  
GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC  
ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG  
GTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC  
AACCGGGGCGAGTGC

10

SEC ID N°: 15

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEC ID N°: 16

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTG  
ACCATCACCTGCCTGGCCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGACCTGGTATCAGCAG  
AAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAACAAGCTGCAGGACGGC  
GTGCCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGC  
AGCCTGCAGCCTGAGGATTTGCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCC  
CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

5

SEC ID N°: 17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRVMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCTTWRIYRDS SGRPFYVMD  
AWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N°: 18

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG  
GTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTGGGTGCGA  
CGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGT  
ACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACA  
GACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTAC  
TGTACCACATGGCGGATATAACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGAT  
GCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG  
GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC  
TGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCC  
CTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC  
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT  
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT  
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC  
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG  
AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC  
CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC  
TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG  
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N°: 19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCTTWRIYRDS SGRPFYVMD  
AWGQGLTVTVSS

SEC ID N°: 20

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG  
GTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTGGGTGCGA  
CGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGT  
ACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACA  
GACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTAC  
TGTACCACATGGCGGATATAACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGAT  
GCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEC ID N°: 21

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMD  
AWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEC ID N°: 22

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG  
GTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTTTGTGCGA  
CGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGT  
ACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGCAGACACATCTACA  
GACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTT

TGTACCACATGGCGGATATAACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGAT  
GCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG  
GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC  
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC  
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT  
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT  
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC  
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG  
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC  
CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC  
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG  
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N°: 23

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDATYFCTTWRIYRDS SGRPFYVMD  
AWGQGLVTVSS

SEC ID N°: 24

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG  
GTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTTTGTGCGA  
CGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGT  
ACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGCAGACACATCTACA  
GACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTT  
  
TGTACCACATGGCGGATATAACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGAT  
GCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEC ID N°: 25

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N°: 26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAG  
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGG  
GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGC  
AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGICTACAGGGTTCCAAGTTTCCG  
CTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT  
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG  
TGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGACAAC  
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC  
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC  
AACAGGGGAGAGTGT

5

SEC ID N°: 27

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGKLEIK

SEC ID N°: 28

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAG  
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGG  
GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGC  
AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCG  
CTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEC ID N°: 29

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N°: 30

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAG  
AAACCAGGGAAAGCCCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGG  
GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACTATCAGC  
AGCCTGCAGCCTGAAGATGAAGGGGATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCG  
CTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT  
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG  
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAAC  
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC  
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC  
AACAGGGGAGAGTGTTAG

5

SEC ID N°: 31

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEC ID N°: 32

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAG  
AAACCAGGGAAAGCCCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGG  
GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACTATCAGC  
AGCCTGCAGCCTGAAGATGAAGGGGATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCG  
CTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

10



SEC ID N°: 33

EVQLQQSGAELVLRPGTSVKLSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGQGLEWIGRIDPEDDS  
TKYAERFKDRATLTAQTSSNTAYLNLSSLTSEDATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMD  
AWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  
CDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI A V E W E S N G Q P E N N  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

SEC ID N°: 34

GAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAG  
TTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGAAATAAGTACAGGATACTATTTCCACTTTGTGAGG  
CGAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGT  
ACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGGGCGACGCTCACTGCACAAACATCCTCC  
AACACAGCCTACCTGAACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACTTATTTT  
TGTACCACATGGCGGATATAACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGAT  
GCCTGGGGTCAAGGAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG  
GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC  
TGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCC

5

CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT  
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT  
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC  
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG  
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC  
CCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC  
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG  
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N°: 35

DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYTYLTWYQQKPKSPQLLIYGANKLQDG  
VPSRFSGSGSGTQYSLKISGIQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N°: 36

GACATTCAAATGACCCAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAAACTGTC  
TCCATCGAATGTCTGGCAAGTGAGGACATATACTTATTTAACATGGTATCAGCAG  
AAACCAGGGAAATCTCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGG  
GTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGCACACAGTATTCTCTCAAGATCAGC  
GGCATAACAACCTGAAGATGAAGGGGATTATTTCTGTCTACAGGGTCCAAGTTTCCG  
CTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT  
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG  
TGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAAC  
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC  
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC  
AACAGGGGAGAGTGT

5

SEC ID N°: 37

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGE  
TIYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCAT

SEC ID N°: 38

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG  
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP

5

SEC ID N°: 39

WGQGLTVTVSS

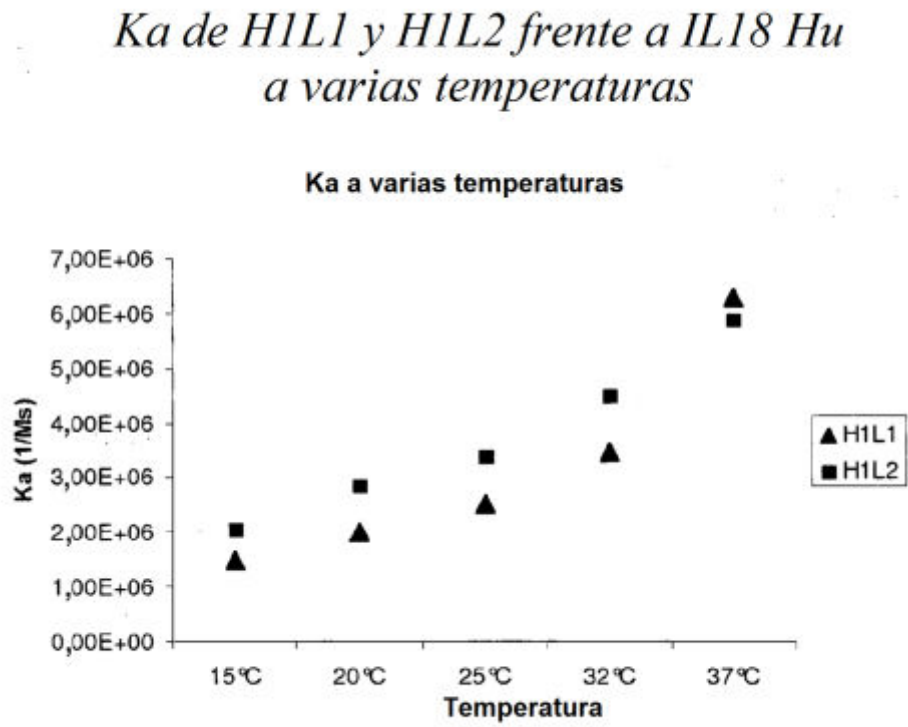
SEC ID N°: 40

FGQGTKLEIK

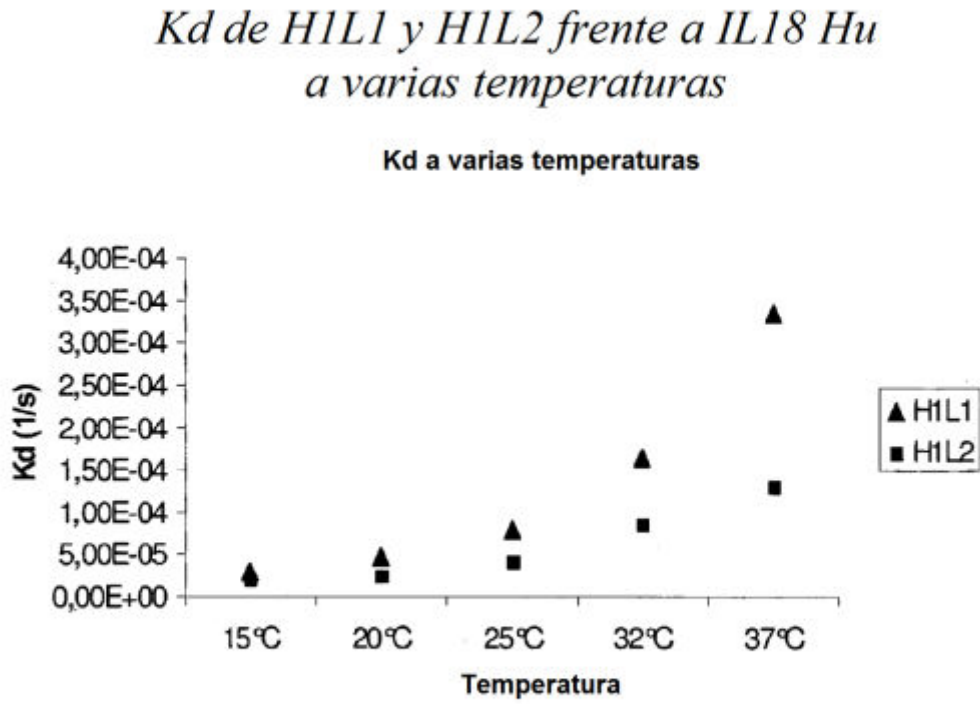
**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti-interleucina-18 humanizado que comprende una región variable de cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 11 y una región variable de cadena ligera como se expone en SEC ID N°: 15.
- 5 2. Un anticuerpo anti-interleucina-18 humanizado como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 9 y una cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 13.
3. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-interleucina-18 de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 para su uso como un medicamento.
- 10 5. Un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 4 en el que el medicamento es para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
6. Un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 5, en el que la enfermedad autoinmune está seleccionada del grupo que consiste en: esclerosis múltiple, enfermedades artríticas tales como artritis reumatoide, diabetes tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y psoriasis.
- 15 7. El uso de un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
8. Un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo como se define en la reivindicación 1.
9. Un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo como se define en la reivindicación 2.
- 20 10. Un vector que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2.
11. Una célula hospedadora transformada de manera estable que comprende un vector como se reivindica en la reivindicación 10.
- 25 12. Una célula hospedadora transformada de manera estable que comprende un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica la cadena pesada de un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2.
13. Un procedimiento de producción de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, cuyo procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector o vectores que codifican dicho anticuerpo en condiciones permisivas para la expresión de dicho anticuerpo.
- 30 14. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 13 en el que el polinucleótido que codifica la cadena ligera y el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo son insertados en el mismo vector e introducidos en la célula hospedadora.
- 35 15. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 13 en el que el polinucleótido que codifica la cadena ligera y el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo son insertados en vectores separados e introducidos en la misma célula hospedadora de manera concurrente o secuencial.

**Figura 1. Efecto de la temperatura en la tasa directa (ka) de H1L1 y H1L2**

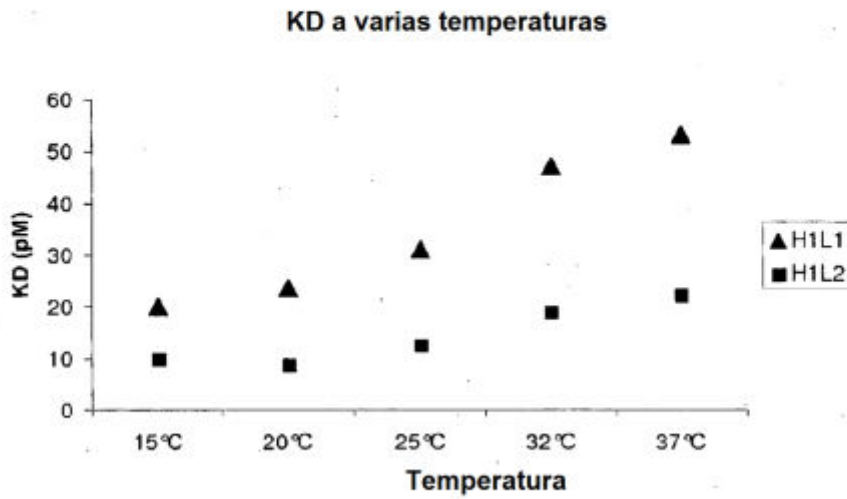


**Figura 2. Efecto de la temperatura en la tasa inversa (kd)**



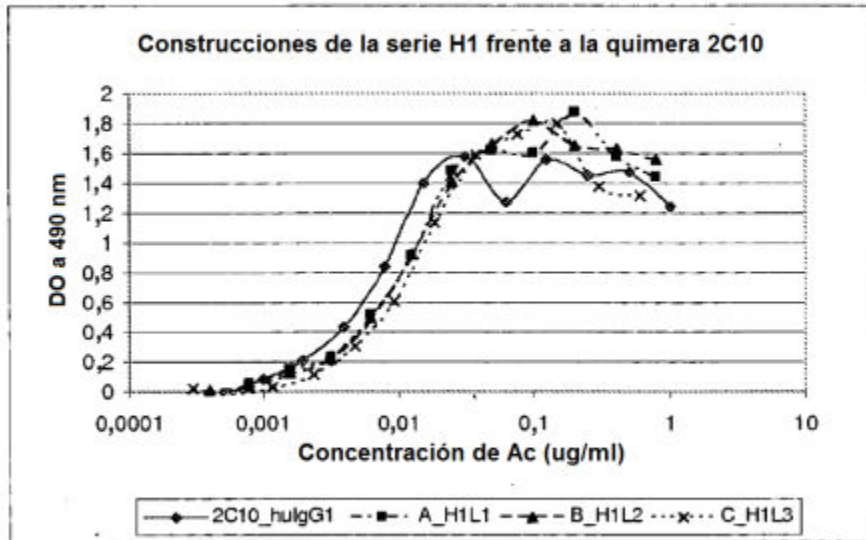
**Figura 3. Efecto de la temperatura en la constante de equilibrio (KD)**

*KD de H1L1 y H1L2 frente a IL18 Hu  
a varias temperaturas*



**Figura 4:**

**A**



**B**

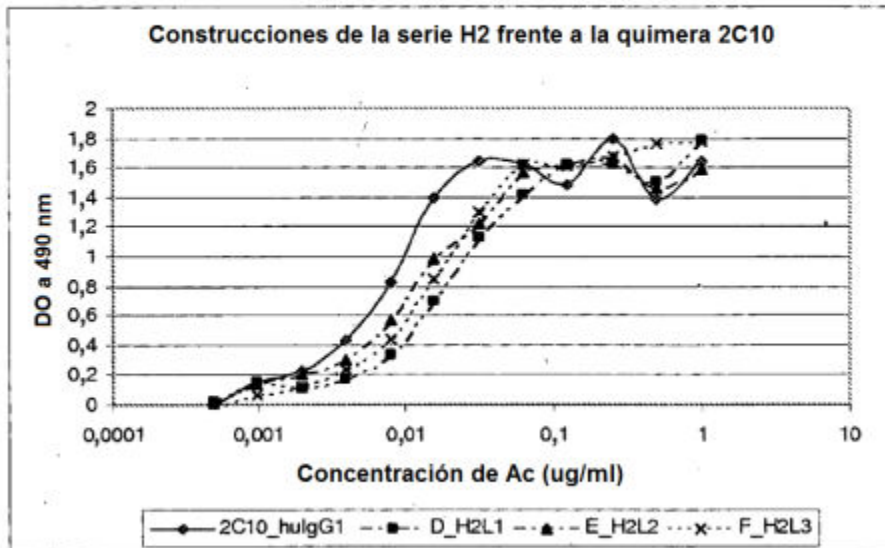
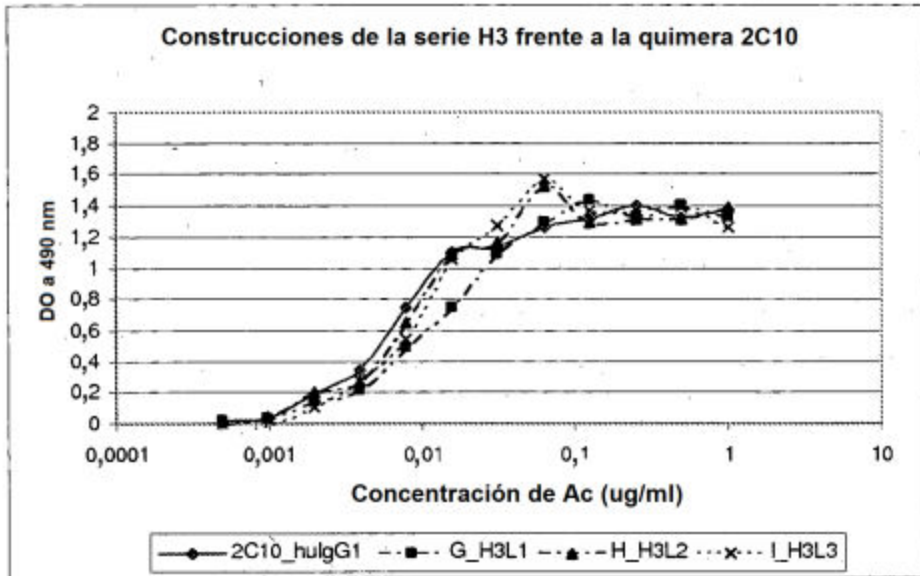
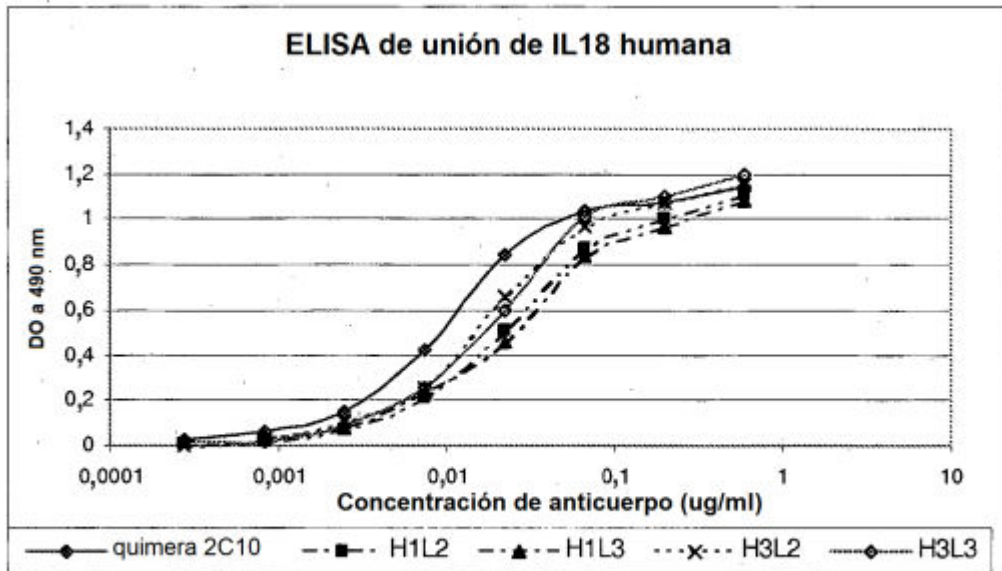




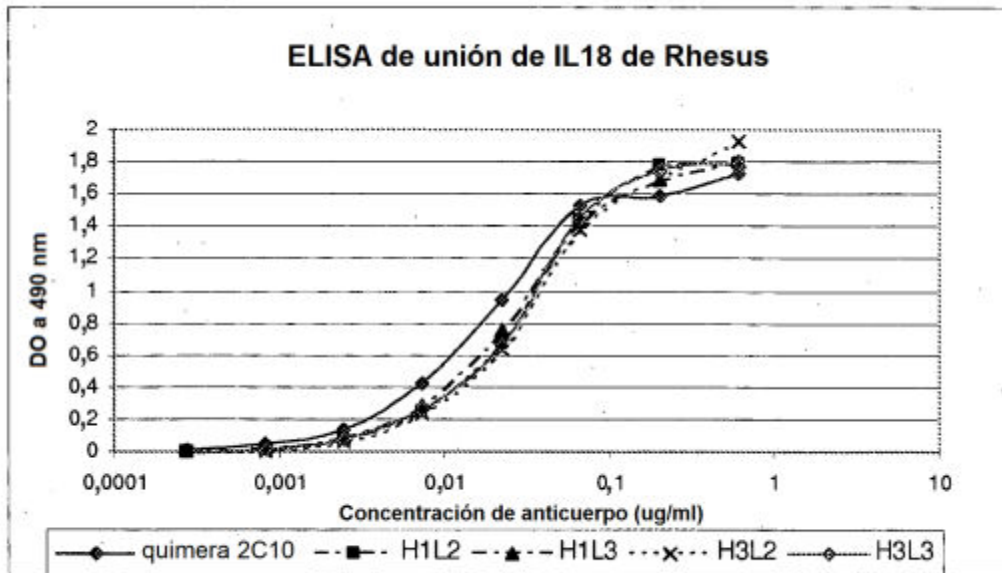
Figura 4C



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

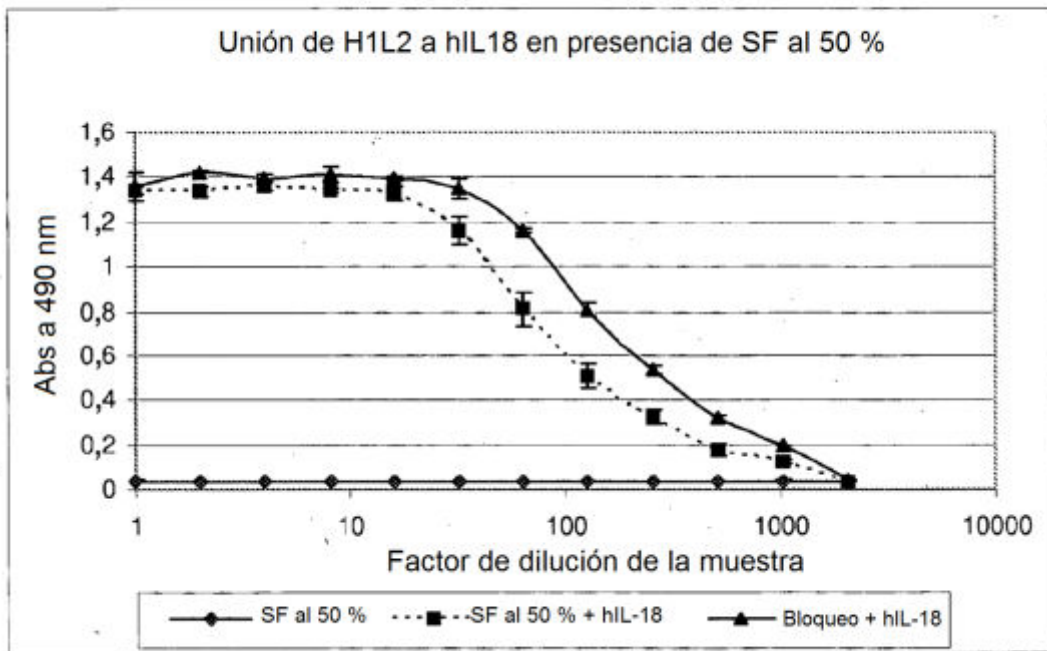


Figura 8

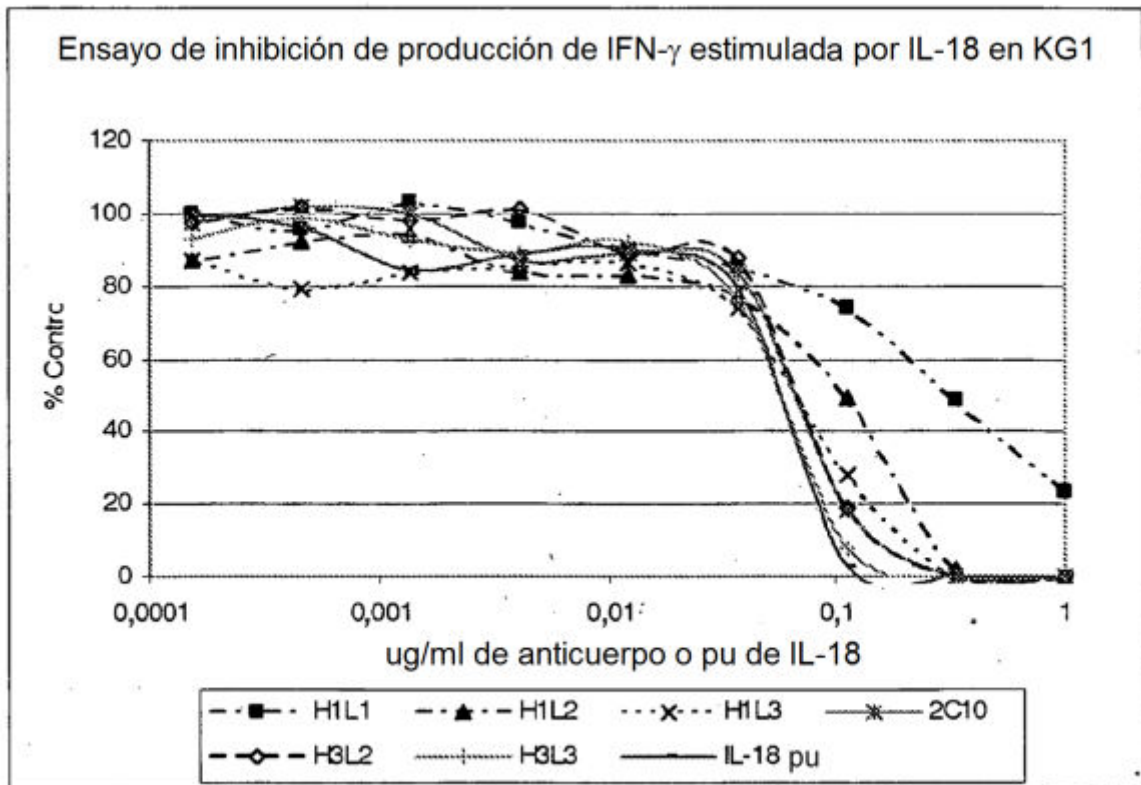
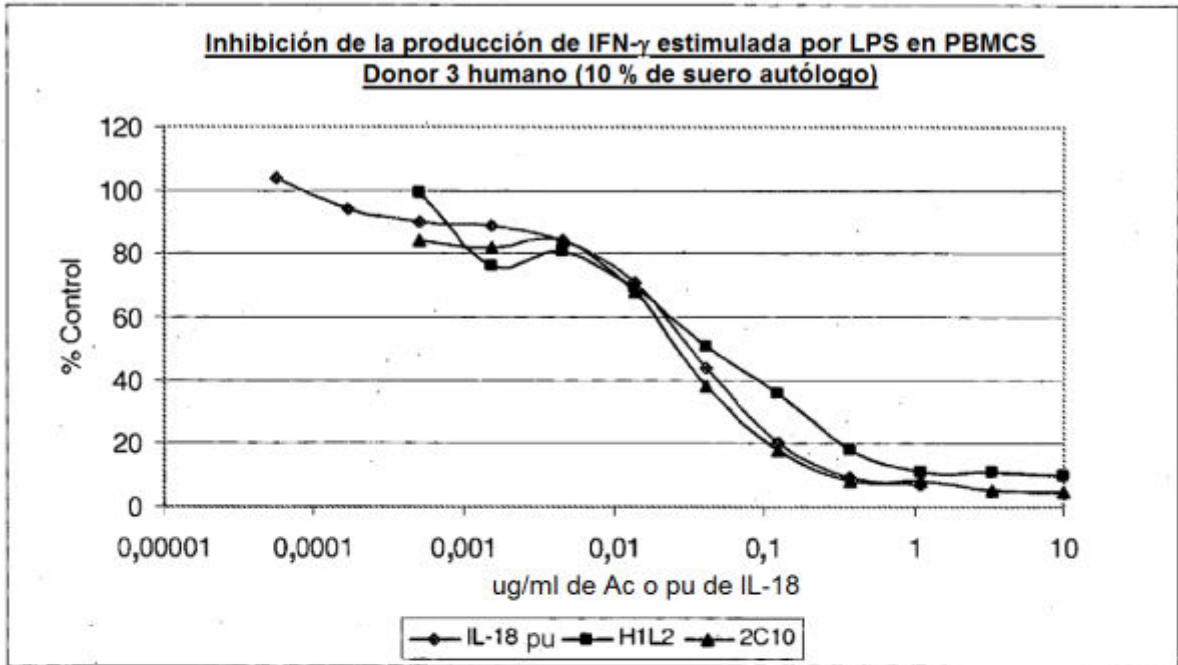
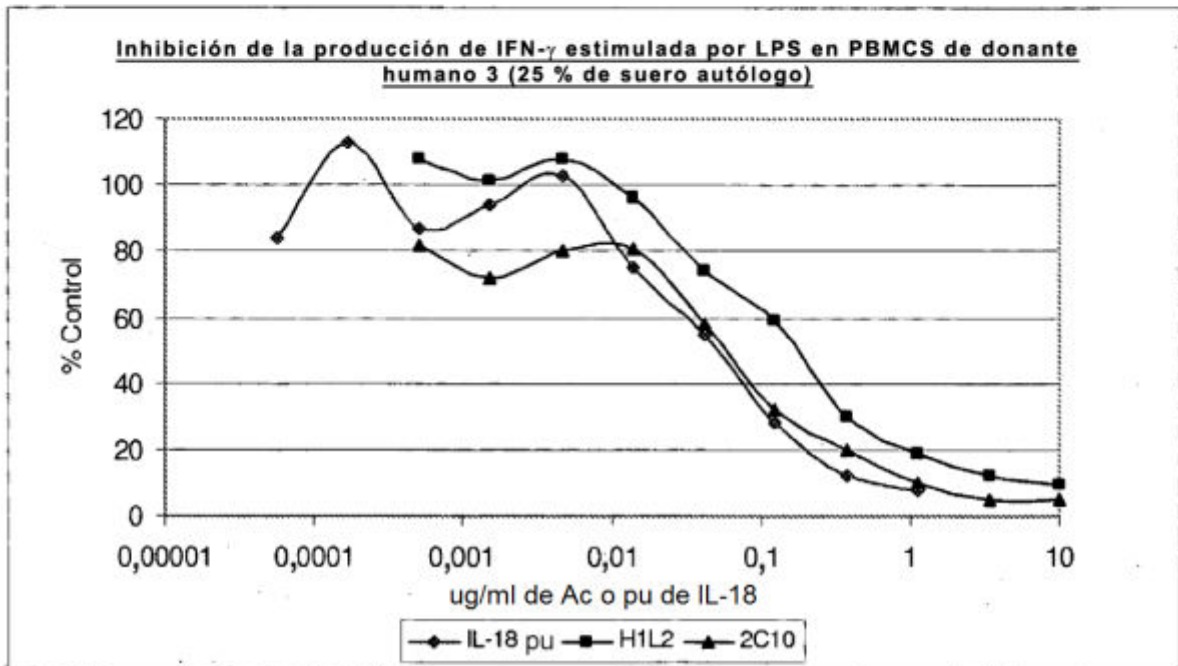


Figura 9

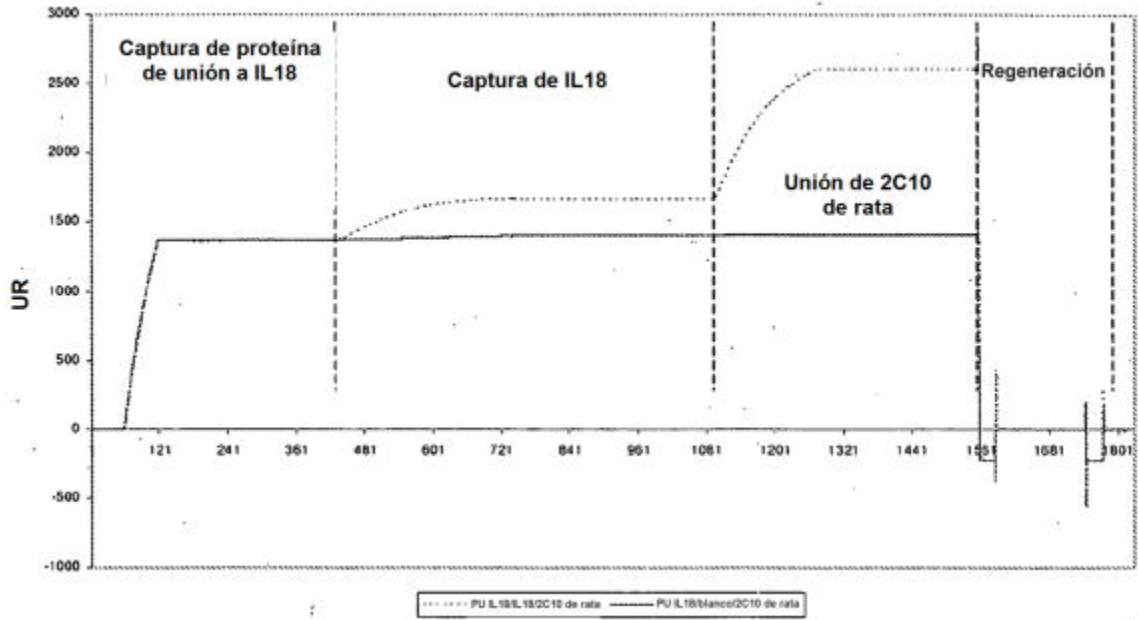
**A**



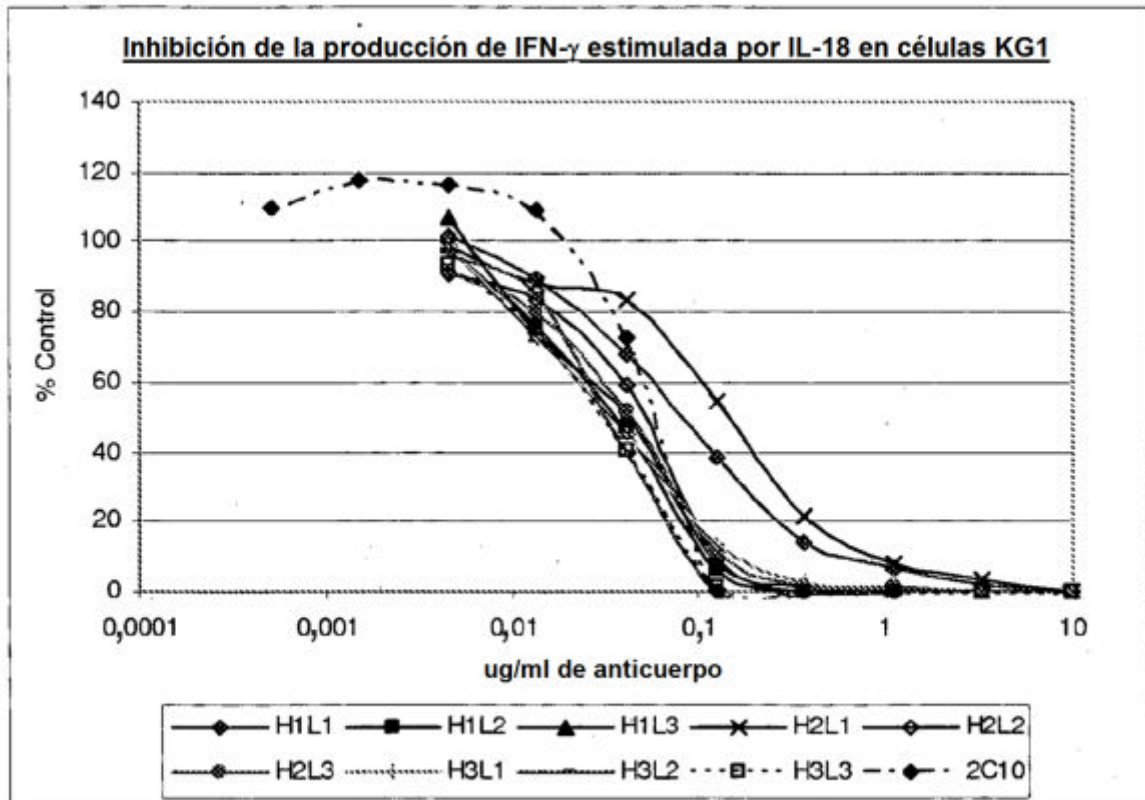
**B**



**Figura 10**

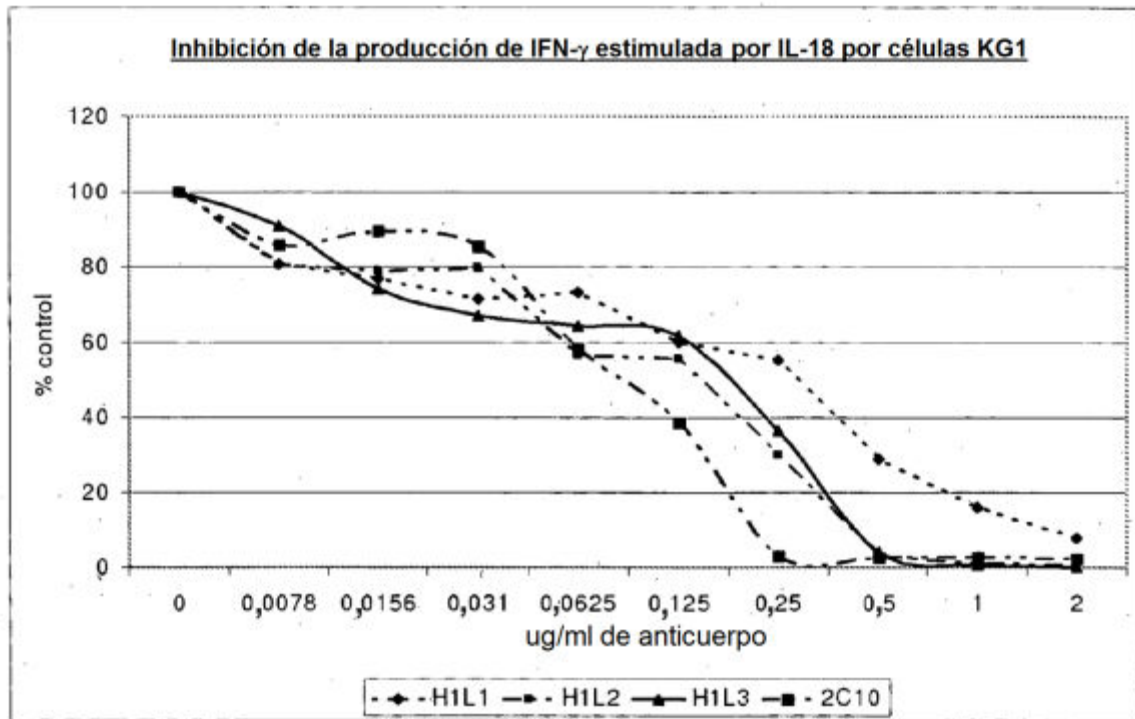


**Figura 11**

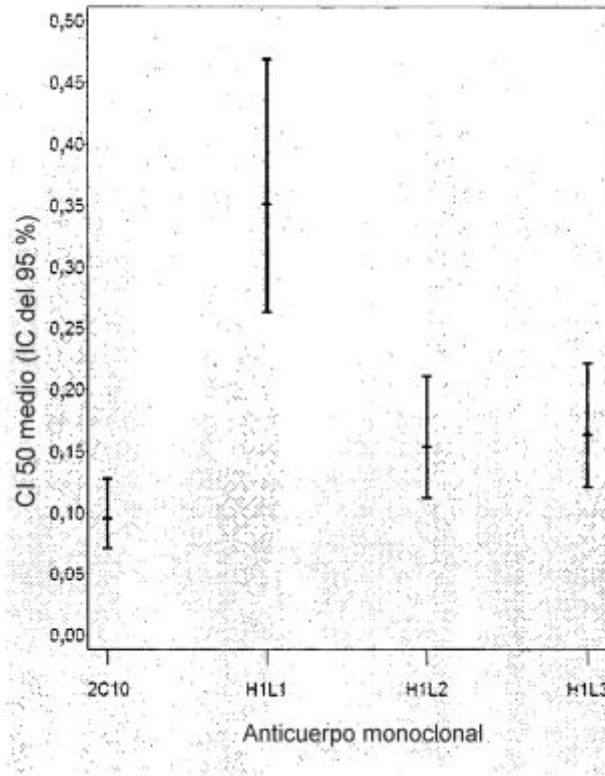




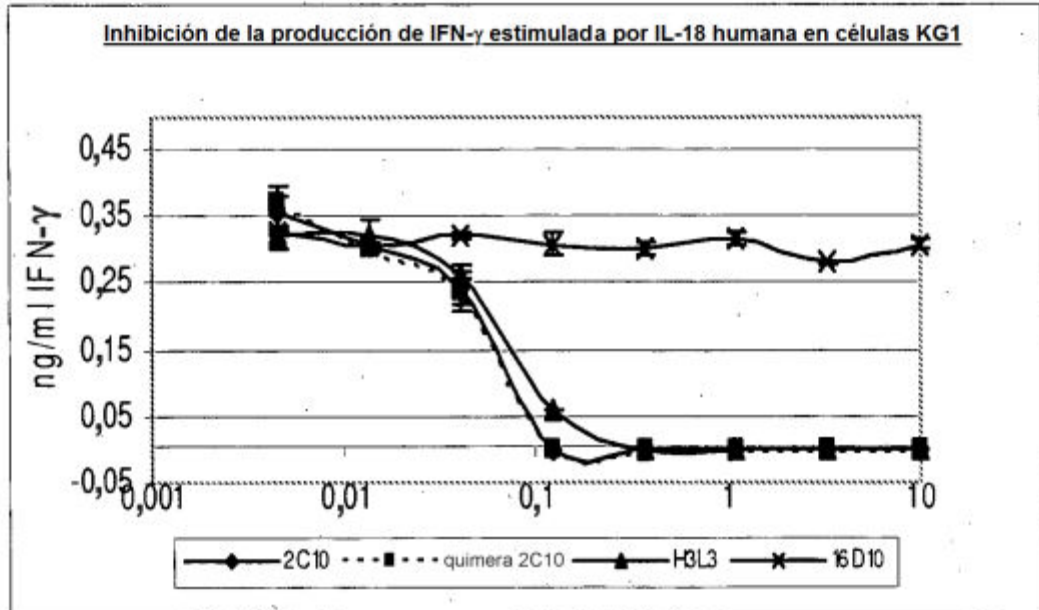
**Figura 12**



**Figura 13 - Valores de CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada anticuerpo monoclonal con un 95 % de intervalo de confianza**



**Figura 14**



**Figura 15**

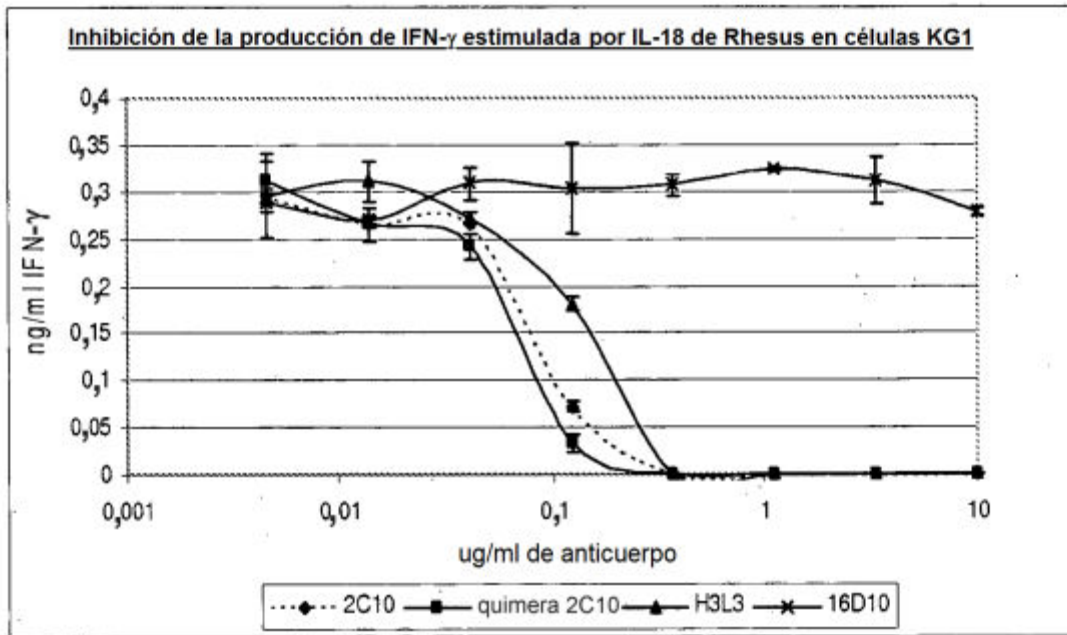
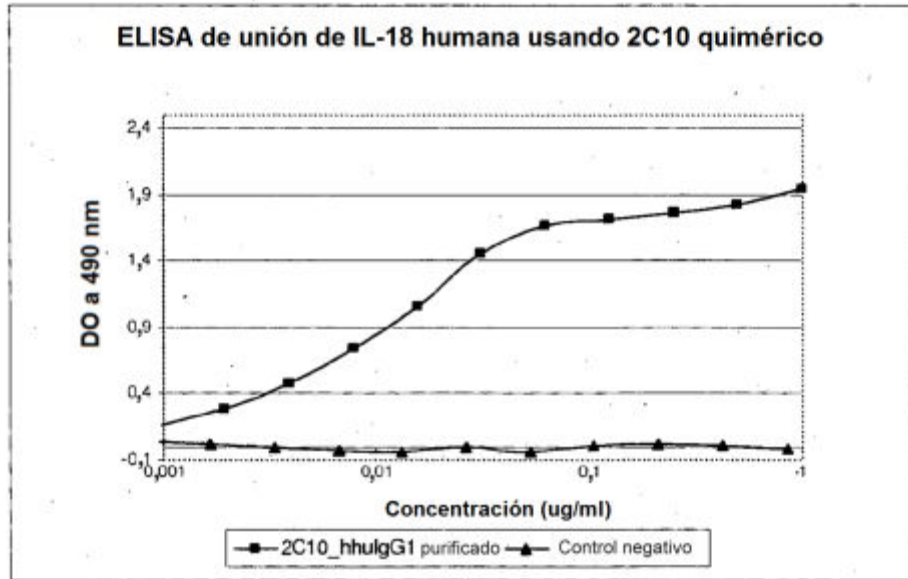


Figura 16



**Figura 17**

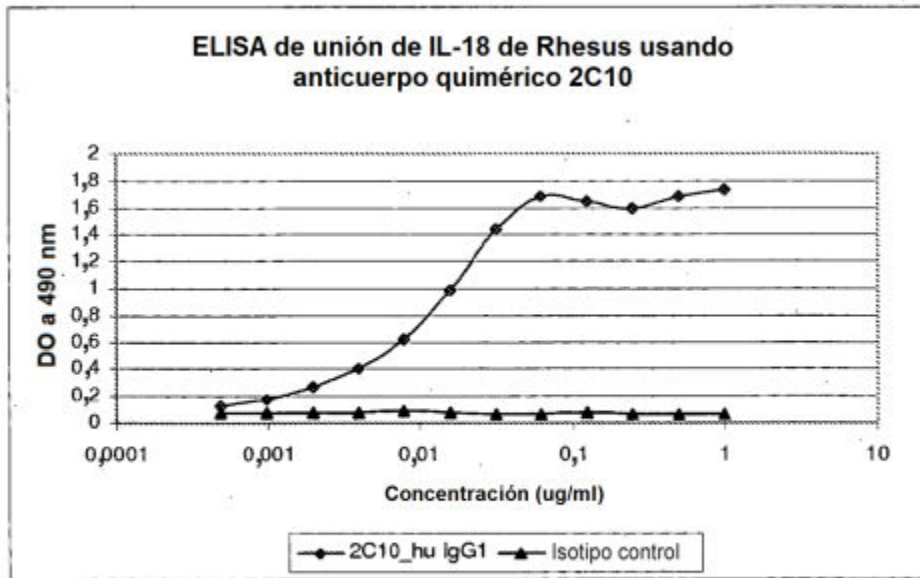
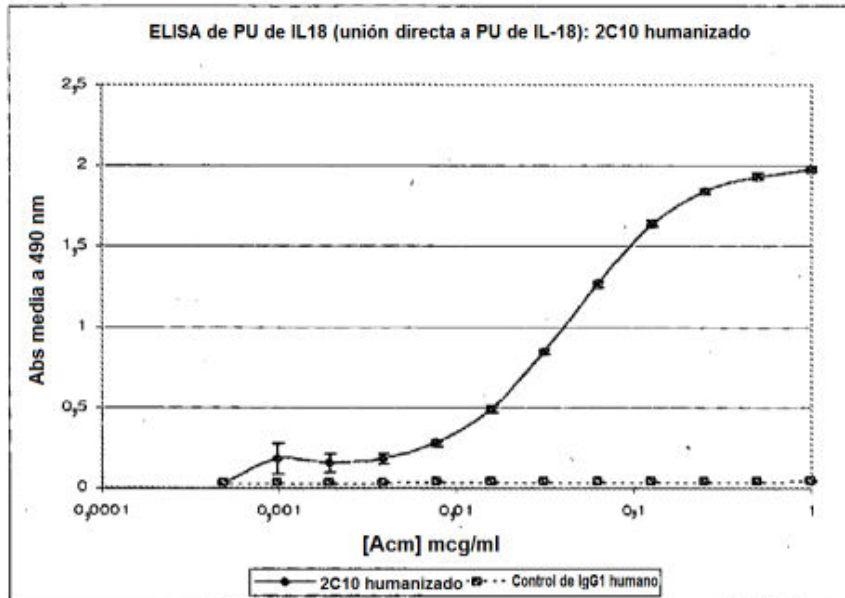


Figura 18A y 18B

**A)**



**B)**

