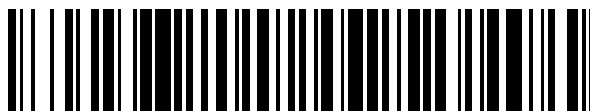


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 194**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2005** **E 05787743 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 1781705**

54 Título: **Anticuerpos del receptor 1 de interferón alfa, y sus usos**

30 Prioridad:

**21.06.2004 US 581747 P**

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

**08.01.2015**

73 Titular/es:

**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**CARDARELLI, JOSEPHINE M.;  
WITTE, ALISON y  
SRINIVASAN, MOHAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 526 194 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 del receptor 1 de interferón alfa, y sus usos

5 **Antecedentes de la invención**

Los interferones tipo I (IFN) (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ ), son una familia de citocinas estructuralmente relacionadas que tienen efectos antivirales, antitumorales e inmunomoduladores (Hardy *et al.* (2001) *Blood* 97: 473; Cutrone y Langer (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 17140). El locus del IFN $\alpha$  humano incluye dos subfamilias. La primera subfamilia  
10 consiste de 14 genes no alélicos y 4 pseudogenes que tienen por lo menos 80 % de homología. La segunda subfamilia,  $\alpha$ II u omega ( $\omega$ ), contiene 5 pseudogenes y un gen funcional que exhibe 70 % de homología con los genes del IFN $\alpha$  (Weissmann y Weber (1986) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 33: 251-300). Los subtipos de IFN $\alpha$  tienen diferentes actividades específicas, pero poseen el mismo espectro biológico (Streuli *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 78: 2848) y tienen el mismo receptor celular (Agneta M. *et al.*, en "Interferon 5" ed. I. Gresser p. 1-22, Academic Press, Londres 1983).

El interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ) es codificado por un sólo gen que tiene aproximadamente 50 % de homología con los genes del IFN $\alpha$ .

20 El interferón gamma, el cual es producido por linfocitos activados, no posee homología alguna con los interferones alfa/beta, y no reacciona con su receptor.

Todos los interferones tipo I humanos se unen a un receptor de superficie celular (receptor de IFN alfa, IFNAR), que consiste de dos proteínas de transmembrana, IFNAR-1 e IFNAR-2 (Uze *et al.* (1990) *Cell* 60: 225; Novick *et al.* (1994) *Cell* 77: 391). El IFNAR-1 es esencial para la unión de alta afinidad y especificidad diferencial del complejo del IFNAR (Cutrone, 2001, citado anteriormente). Aunque no se han identificado diferencias funcionales para cada uno de los subtipos de IFN tipo I, se piensa que cada uno puede exhibir diferentes interacciones con los componentes del receptor IFNAR que llevan a resultados de señalización potencialmente diversos (Cook *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 13448). En particular, estudios que usan formas mutantes de IFNAR 1 e IFNAR2  
30 sugirieron que los interferones alfa y beta señalizan diferentemente a través del receptor, interactuando diferencialmente con cadenas respectivas (Lewerenz *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 282: 585).

Los primeros estudios funcionales de IFN tipo I, se enfocaron en la defensa innata contra infecciones virales (Haller *et al.* (1981) *J. Exp. Med.* 154: 199; Lindenmann *et al.* (1981) *Methods Enzymol.* 78: 181). Sin embargo, estudios más recientes implican a los IFN tipo I como citocinas inmunorreguladoras potentes en la respuesta inmune adaptativa. Específicamente, se ha mostrado que los IFN tipo I facilitan la diferenciación de células T no afectadas a lo largo de la vía Th1 (Brinkmann *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178: 1655), intensifican la producción de anticuerpos (Finkelman *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174: 1179), y sustentan la actividad funcional y supervivencia de células T de memoria (Santini *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 191: 1777; Tough *et al.* (1996) *Science* 272: 1947).

40 Las investigaciones recientes por muchos grupos, sugieren que el IFN- $\alpha$  puede mejorar la maduración o activación de células dendríticas (CD) (Santini, *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 191: 1777; Luft *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161: 1947; Luft *et al.* (2002) *Int. Immunol.* 14: 367; Radvanyi *et al.* (1999) *Scand. J. Immunol.* 50: 499). Además, se ha descrito expresión incrementada de interferones tipo I en numerosas enfermedades autoinmunes (Foulis *et al.* (1987) *Lancet* 2: 1423; Hooks *et al.* (1982) *Arthritis Rheum.* 25: 396; Hertzog *et al.* (1988) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 48: 192; Hopkins y Meager (1988) *Clin. Exp. Immunol.* 73: 88; Arvin y Miller (1984) *Arthritis Rheum.* 27: 582). Los ejemplos más estudiados de estas enfermedades, son la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) (Foulis (1987), citado anteriormente) y el lupus eritematoso sistémico (LSE) (Hooks (1982), citado anteriormente), los cuales se asocian con niveles elevados de IFN- $\alpha$ , y la artritis reumatoide (RA) (Hertzog (1988), Hopkins y Meager (1988), Arvin y Miller (1984), citados anteriormente), en la cual el IFN- $\beta$  puede desempeñar una función más significativa.

Además, se ha informado de que la administración de interferón  $\alpha$  exagera la enfermedad subyacente en pacientes con psoriasis y esclerosis múltiple, e induce un síndrome tipo LSE en pacientes sin una historia previa de enfermedad autoinmune. Se ha mostrado también que el interferón  $\alpha$  induce glomerulonefritis en ratones normales, y acelera el inicio de enfermedad autoinmune espontánea de ratones NZB/W. Además, se ha mostrado que la terapia con IFN- $\alpha$  en algunos casos lleva a efectos secundarios no deseados, que incluyen fiebre y trastornos neurológicos. Por consiguiente, existen situaciones patológicas en las cuales la inhibición de la actividad del IFN tipo I puede ser benéfica para el paciente, y existe la necesidad de agentes efectivos en la inhibición de la actividad del IFN tipo I.

60 El documento US 6.713.609 B1 describe varios anticuerpos murinos anti-IFNAR-1. El documento WO 2004/094473 A2 describe anticuerpos humanizados anti-IFNAR-1 derivados del anticuerpo monoclonal murino 64G12 que contiene las CDR de 64G12 o derivadas de las mismas y que se unen al mismo epítipo que 64G12.

65 Goldman *et al.*, *J INF CYTO RES* vol. 19, N°. 1, 1999, páginas 15-26, describen anticuerpos murinos dirigidos a

IFNAR-1 de ser humano. Uno de dichos anticuerpos, EA12, Inhibe la unión y la actividad de IFN $\alpha$ 2a e IFN $\alpha$ 2b. La especificidad de epítipo de EA12 se estudió usando una quimera humana-bovina de IFNAR-1. Se descubrió que EA12 tiene un patrón de reconocimiento de epítipo complejo y que reacciona moderadamente con la quimera HHBB. La quimera HHBB contiene los dominios extracelulares SD1 y SD2 de IFNAR-1 de ser humano. Goldman et al., afirman además que el anticuerpo murino monoclonal 64G12 se une a la mitad N-terminal del dominio extracelular de IFNAR-1, es decir, los restos 27 a 230 de SD1 y SD2.

**Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a la materia objeto definida en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la presente invención provee anticuerpos monoclonales humanos aislados que se unen al IFNAR-1, e inhiben la actividad biológica del interferón tipo I, de preferencia interferones tipo I múltiples. Además, los anticuerpos no se unen al mismo epítipo que el anticuerpo anti-IFNAR-1 de murino, 64G12.

En un aspecto, la invención pertenece a un anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se une específicamente al IFNAR-1, y exhibe una o más de las siguientes propiedades:

- a) se une al IFNAR-1 con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o mayor afinidad;
- b) inhibe la actividad biológica de interferones tipo I múltiples;
- c) inhibe la actividad de IFN  $\alpha$  2b en una prueba de proliferación de células de Daudi;
- d) inhibe la actividad de IFN omega en una prueba de proliferación de células de Daudi;
- e) inhibe la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica inducida por IFN  $\alpha$  2b;
- f) inhibe la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica inducida por IFN omega;
- g) inhibe el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma del lupus eritematoso sistémico; y
- h) se une a un epitopo diferente del anticuerpo monoclonal de murino 64G12 (número de depósito de ECACC 92022605).

Los anticuerpos preferidos de la invención se unen específicamente al receptor 1 de interferón alfa humano, y se unen con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o mayor afinidad, o  $1 \times 10^{-9}$  M o mayor afinidad, o  $5 \times 10^{-10}$  M o mayor afinidad, o  $2 \times 10^{-10}$  M o mayor afinidad.

En un aspecto, la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o derivado de, un gen de  $V_H$  4-34 ó 5-51 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente al receptor 1 de interferón alfa humano. En otro aspecto, la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, o derivado de, un gen de  $V_K$  L18 o A27 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente al receptor 1 de interferón alfa humano. En otro aspecto, la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que es el producto de, o derivado de, un gen de  $V_H$  4-34 ó 5-51 humano; y
- (b) una región variable de cadena ligera que es el producto de, o derivado de, un gen de  $V_K$  L18 o A27 humano; en donde el anticuerpo se une específicamente al receptor 1 de interferón alfa humano. En modalidades preferidas, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de un gen de  $V_H$  4-34 humano, y una región variable de cadena ligera de un gen de  $V_K$  L18 humano, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de un gen de  $V_H$  5-51 humano, y una región variable de cadena ligera de un gen de  $V_K$  A27 humano.

En otro aspecto, la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada humana y una región variable de cadena ligera humana, en donde:

- (a) la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 25, 26 y 28;
- (b) la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 29, 30, 31 y 32;
- (c) el anticuerpo se une específicamente al receptor 1 de interferón alfa humano con una afinidad de unión de por lo menos  $1 \times 10^{-8}$  M o mayor afinidad; y
- (d) el anticuerpo inhibe la actividad biológica de por lo menos un interferón tipo I.

Otros anticuerpos preferidos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales humanos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°: 25, 26 y 28; y

(b) una región variable de cadena ligera humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°: 29, 30 y 32;

5 en donde el anticuerpo se une específicamente al receptor 1 de interferón alfa humano con una afinidad de unión de por lo menos  $1 \times 10^{-8}$  M o mayor afinidad.

Combinaciones preferidas de cadenas ligera y pesada, incluyen las siguientes:

10 (a) una región variable de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25; y

(b) una región variable de cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29.

15 (a) una región variable de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26; y

(b) una región variable de cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30.

(a) una región variable de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28; y

20 (b) una región variable de cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.

En ciertas modalidades, la invención provee un anticuerpo humano, o porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo no se une al mismo epítipo que (es decir, no compite en forma cruzada con) el anticuerpo monoclonal de ratón 64G12 (número de depósito de ECACC 92022605).

25 Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier isotipo. Anticuerpos preferidos son del isotipo IgG1, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos de longitud completa que comprendan regiones variables y constantes, o pueden ser fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como un anticuerpo de cadena sencilla, o un fragmento Fab o Fab'2.

30 La invención provee también un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o porción de unión a antígeno del mismo, enlazado a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo. La invención provee también una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, enlazado a una segunda porción funcional que tiene una diferente especificidad de unión que dicho anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.

35 Se proveen también composiciones que comprenden un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o inmunoconjugado o molécula biespecífica de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención, son también contempladas por la invención, así como vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión. Además, la invención provee un ratón transgénico que comprende transgenes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana, en donde el ratón expresa un anticuerpo de la invención, así como hibridomas preparados de dicho ratón, en donde el hibridoma produce el anticuerpo de la invención.

45 La invención provee también los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por interferón tipo I en un sujeto que necesita de tratamiento, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, de modo que la enfermedad mediada por interferón tipo I en el sujeto sea tratada. La enfermedad  
50 mediada por interferón tipo I puede ser, por ejemplo, una enfermedad mediada por interferón alfa.

Ejemplos de enfermedades o trastornos que pueden tratarse usando los métodos de la invención, incluyen lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, glomerulonefritis, infección por VIH, SIDA, rechazo de  
55 trasplante y enfermedad de injerto contra hospedero.

### Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 33) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 25), de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3F11. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 1), CDR2 (SEC ID N°: 5) y CDR3 (SEC ID N°: 9), están delineadas.

65 La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 37) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 29), de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 3F11. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 13), CDR2 (SEC ID N°: 17) y CDR3 (SEC ID N°: 21), están delineadas.

La figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 34) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 26), de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4G5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 2), CDR2 (SEC ID N°: 6) y CDR3 (SEC ID N°: 10), están delineadas.

5 La figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 38) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 30), de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4G5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 14), CDR2 (SEC ID N°: 18) y CDR3 (SEC ID N°: 22), están delineadas.

10 La figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 35) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 27), de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11E2. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 3), CDR2 (SEC ID N°: 7) y CDR3 (SEC ID N°: 11), están delineadas.

15 La figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 39) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 31), de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 11E2. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 15), CDR2 (SEC ID N°: 19) y CDR3 (SEC ID N°: 23), están delineadas.

20 La figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 36) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 28), de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 9D4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 4), CDR2 (SEC ID N°: 8) y CDR3 (SEC ID N°: 12), están delineadas.

La figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 40) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 32), de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 9D4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 16), CDR2 (SEC ID N°: 20) y CDR3 (SEC ID N°: 24), están delineadas.

25 La figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 3F11, con la secuencia de aminoácidos de  $V_H$  4-34 de la línea germinal humana (SEC ID N°: 41).

30 La figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 4G5, con la secuencia de aminoácidos de  $V_H$  4-34 de la línea germinal humana (SEC ID N°: 41).

La figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 11E2 y 9D4, con la secuencia de aminoácidos de  $V_H$  5-51 de la línea germinal humana (SEC ID N°: 42).

35 La figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3F11, con la secuencia de aminoácidos de  $V_K$  L18 de la línea germinal humana (SEC ID N°: 43).

La figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 4G5, con la secuencia de aminoácidos de  $V_K$  L18 de la línea germinal humana (SEC ID N°: 43).

40 La figura 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 11E2 y 9D4, con la secuencia de aminoácidos de  $V_K$  A27 de la línea germinal humana (SEC ID N°: 44).

45 La figura 11 es una gráfica que muestra los resultados de experimentos que demuestran que el anticuerpo monoclonal humano 3F11, dirigido contra el IFNAR-1 humano, no compite con el anticuerpo monoclonal de ratón 64G12 por su unión al IFNAR-1.

### Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados que se unen al receptor 1 de interferón alfa (IFNAR-1), y que son capaces de bloquear la acción de interferones tipo I. La invención provee anticuerpos aislados, métodos para producir dichos anticuerpos, inmunocombinados y moléculas bispecíficas que comprenden dichos anticuerpos, y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunocombinados o moléculas bispecíficas de la invención. Además, se describen en el presente documento métodos de uso de los anticuerpos para inhibir la unión de un interferón tipo I al IFNAR-1 en una célula que expresa el IFNAR-1, por ejemplo, en el  
55 tratamiento de trastornos mediados por la respuesta inmune, que incluyen trastornos autoinmunes, rechazo de trasplante y enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), en un sujeto.

60 Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen primero. Otras definiciones se exponen a lo largo de la descripción detallada.

65 Los términos "receptor 1 de interferón alfa", "IFNAR-1" y "antígeno de IFNAR-1" se usan recíprocamente, e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especie del IFNAR-1 humano, y análogos que tienen por lo menos un epítipo común con el IFNAR-1. Por consiguiente, los anticuerpos humanos de la invención pueden, en ciertos casos, reaccionar en forma cruzada con el IFNAR-1 de especies diferentes del humano, u otras proteínas que están relacionadas estructuralmente con el IFNAR-1 humano (por ejemplo, homólogos del IFNAR-1 humano). En otros casos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos del IFNAR-1 humano, y no exhiben reactividad

cruzada con otras especies u otros tipos de reactividad cruzada.

La secuencia de ADNc completa del IFNAR-1 humano, tiene el número de acceso de Genebank NM\_000629.

5 El término "interferón tipo I", como se usa en la presente, se usa para referirse a miembros de la familia de moléculas de interferón tipo I que son ligandos para el IFNAR-1 (es decir, miembros de la familia de moléculas de interferón tipo I que son capaces de unión al IFNAR-1). Ejemplos de ligandos de interferón tipo I, son interferón alfa 1, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 21, interferón beta e interferón omega.

10 El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células que presentan antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complementos) que resultan en daño selectivo a, destrucción de, o eliminación de, patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales, del cuerpo humano.

15 Una "vía de transducción de señales", se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señales que desempeñan una función en la transmisión de una señal desde una porción de una célula hasta otra porción de una célula. Como se usa en la presente, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal, y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención, es el receptor IFNAR-1.

20 El término "anticuerpo", como es referido en la presente, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno"), o cadenas sencillas del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR1), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  se forma de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedero, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complementos.

30 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente, "porción de anticuerpo"), como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, el IFNAR-1). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo, puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste de un dominio  $V_H$ ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , son codificados por genes separados, pueden ser unidos usando métodos recombinantes, por medio de un enlazador sintético que les permite ser producidos como una cadena sencilla de proteína en la cual el par de regiones  $V_L$  y  $V_H$  forma moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Se pretende también que dichos anticuerpos de cadena sencilla sean abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad de la misma forma como los anticuerpos intactos.

50 Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente, se usa para referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al IFNAR-1, está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes del IFNAR-1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente al IFNAR-1 puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IFNAR-1 de otra especie. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales y/o químicos celulares.

65 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en la presente, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular individual. Una composición de

anticuerpo monoclonal exhibe una especificidad de unión y afinidad individual por un epítipo particular.

El término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, se usa para incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales las regiones CDR y de estructura se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro*, o por mutaciones somáticas *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, no se usa para incluir anticuerpos en los cuales secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de estructura humanas.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que exhiben una especificidad de unión individual que tiene regiones variables en las cuales las regiones CDR y de estructura se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana, o un hibridoma preparado de los mismos (descritos más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada que expresa el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una colección combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por medio de cualquier otro medio que implique empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana u otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones CDR y de estructura se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), y de esta manera las secuencias de aminoácidos de las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  de la línea germinal humana, pueden no existir en forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en la presente, el término “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por los genes de la región constante de cadena pesada.

Como se usa en la presente, el término “unión específica” se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-7}$  M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una  $K_D$  que es por lo menos dos veces menor que su  $K_D$  para unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico de un antígeno”, se usan recíprocamente en la presente con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término “ $K_{asoc}$ ” o “ $K_a$ ”, como se usa en la presente, se usa para referirse a la velocidad de asociación de una interacción particular de antígeno-anticuerpo, mientras que el término “ $K_{dis}$ ” o “ $K_d$ ”, como se usa en la presente, se usa para referirse a la velocidad de disociación de una interacción particular de antígeno-anticuerpo. El término “ $K_D$ ”, como se usa en la presente, se usa para referirse a la constante de disociación, la cual se obtiene de la relación de  $K_d$  a  $K_a$  (es decir,  $K_d/K_a$ ), y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo, es usando la técnica de resonancia de plasmón superficial, de preferencia usando un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore®.

Como se usa en la presente, el término “alta afinidad” por un anticuerpo de IgG, se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-8}$  M o menos, más preferiblemente  $10^{-9}$  M o menos, y aún más preferiblemente  $10^{-10}$  M o menos. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo de IgM, se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos, más preferiblemente  $10^{-8}$  M o menos.

Como se usa en la presente, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-IFNAR-1

5 Los anticuerpos de la invención se caracterizan por propiedades o características funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente al IFNAR-1, de preferencia el IFNAR-1 humano. Además, los anticuerpos pueden reaccionar en forma cruzada con el IFNAR-1 de uno o más primates no humanos, tales como monos cynomolgus y/o monos rhesus. De preferencia, un anticuerpo de la invención se une al IFNAR-1 con alta afinidad, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos, más preferiblemente con una  $K_D$  de  $10^{-8}$  M o menos, o  $10^{-9}$  M o menos, o aún  $5 \times 10^{-10}$  M o menos, o  $2 \times 10^{-10}$  M o menos.

15 Además, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la actividad biológica de interferones tipo I. Los anticuerpos inhiben la actividad biológica de por lo menos un interferón tipo I, y de preferencia inhiben la actividad biológica de interferones tipo I múltiples (es decir, por lo menos dos, más preferiblemente por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos 11, o por lo menos 12, o por lo menos 13 o por lo menos 14, o por lo menos 15, diferentes subtipos de interferón tipo I). En una modalidad preferida, el anticuerpo inhibe la actividad biológica de los siguientes interferones tipo I:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2a$ ,  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 14$ ,  $\alpha 16$ ,  $\alpha 17$ ,  $\alpha 21$ , beta y omega. En otras modalidades preferidas, el anticuerpo inhibe la actividad del IFN linfoblastoide y/o el IFN de leucocitos.

25 La capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad biológica de interferones tipo I, puede examinarse en una o más pruebas establecidas en la técnica. Ejemplos no limitativos incluyen inhibición de la proliferación de células de Daudi mediada por IFN tipo I, inhibición de la expresión de IP-10 inducida por IFN tipo I por células mononucleares de sangre periférica (PBMC), inhibición del desarrollo de células dendríticas mediado por plasma del lupus eritematoso sistémico (LSE), e inhibición de la actividad antiviral de IFN tipo I. Un anticuerpo "inhibe la actividad biológica de interferones tipo I", si inhibe la actividad por cuando menos 20 %, más preferiblemente por cuando menos 30 %, aún más preferiblemente por cuando menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80 % o por lo menos 90 %, en comparación con un anticuerpo control no específico.

30 En modalidades preferidas, el anticuerpo inhibe la actividad de IFN  $\alpha 2b$  en una prueba de proliferación de células de Daudi, inhibe la actividad de IFN omega en una prueba de proliferación de células de Daudi, inhibe la secreción de IP-10 por PBMC inducida por IFN  $\alpha 2b$  o IFN omega, y/o inhibe el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma del LSE.

35 En otra modalidad preferida, el anticuerpo no compite en forma cruzada con (es decir, se une a un epítipo diferente que) el anticuerpo anti-IFNAR-1 de murino 64G12 (depositado como número de depósito de ECACC 92022605).

40 Pruebas para evaluar las actividades funcionales de anticuerpos anti-IFNAR, se describen en más detalle en los ejemplos. Los anticuerpos preferidos de la invención exhiben por lo menos una, más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más, de las siguientes propiedades:

- a) se une específicamente al IFNAR1 (de preferencia al IFNAR1 humano);
- b) se une al IFNAR1 con alta afinidad, tal como una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o mayor afinidad;
- 45 c) inhibe la actividad biológica de interferones tipo I múltiples;
- d) inhibe la actividad de IFN  $\alpha 2b$  en una prueba de proliferación de células de Daudi;
- e) inhibe la actividad de IFN omega en una prueba de proliferación de células de Daudi;
- f) inhibe la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica inducida por IFN  $\alpha 2b$ ;
- 50 g) inhibe la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica inducida por IFN omega;
- h) inhibe el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma del lupus eritematoso sistémico; y
- i) se une a un epítipo diferente que (es decir, no compite en forma cruzada con) el anticuerpo monoclonal de murino 64G12 (número de depósito de ECACC 92022605).

55 Cualquier combinación de las características funcionales descritas anteriormente y/o las características funcionales como se describen en los ejemplos, puede ser exhibida por un anticuerpo de la invención.

Anticuerpo monoclonal 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4

60 Anticuerpos preferidos de la invención, son los anticuerpos monoclonales humanos 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en los ejemplos. Las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 se muestran en las SEC ID N°: 25, 26, 27 y 28, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de  $V_L$  de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 se muestran en las SEC ID N°: 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

65 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse al IFNAR-1, las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  pueden "mezclarse y compararse", para crear otras moléculas de unión anti-IFNAR-1 de la invención. La unión de dichos anticuerpos



“mezclados y comparados” al IFNAR-1, puede ponerse a prueba usando las pruebas de unión descritas en la presente (por ejemplo, ELISA), y/o usando las pruebas de inhibición funcional de IFN tipo I descritas en los ejemplos. De preferencia, cuando las cadenas de  $V_H$  y  $V_L$  se mezclan y comparan, una secuencia de  $V_H$  de un apareamiento de  $V_H/V_L$  particular, es reemplazada con una secuencia de  $V_H$  estructuralmente similar. Asimismo, de preferencia una secuencia de  $V_L$  de un apareamiento de  $V_H/V_L$  particular, es reemplazada con una secuencia de  $V_L$  estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  de 3F11 y 4G5 están particularmente sujetas para mezclado y comparación, puesto que estos anticuerpos usan secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  derivadas de las mismas secuencias de la línea germinal ( $V_H$  4-34 y  $V_k$  L18), y de esta manera exhiben similitud estructural. Además, las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  de 11E2 y 9D4 están particularmente sujetas para mezclado y comparación, puesto que estos anticuerpos usan secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  derivadas de las mismas secuencias de la línea germinal ( $V_H$  5-51 y  $V_k$  A27), y de esta manera exhiben similitud estructural.

Combinaciones preferidas de cadena ligera y pesada, incluyen:

- 15 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29; o
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30; o
- 20 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32

La invención provee anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de 3F11, 4G5 y 9D4 de las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

25 Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 de  $V_H$ , se muestran en las SEC ID N°: 1, 2, 3 y 4. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 de  $V_H$ , se muestran en las SEC ID N°: 5,6, 7 y 8. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 de  $V_H$ , se muestran en las SEC ID N°: 9,10, 11 y 12. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 de  $V_k$ , se muestran en las SEC ID N°: 13, 14, 15 y 16. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 de  $V_k$ , se muestran en las SEC ID N°: 17, 18, 19 y 20. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 de  $V_k$ , se muestran en las SEC ID N°: 21, 22, 23 y 24. Las regiones CDR son delineadas usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U. S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH No. 91-3242).

35 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse al IFNAR-1, y la especificidad de unión al antígeno es provista principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_k$  pueden “mezclarse y compararse” (es decir, CDR de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y compararse, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  y una CDR1, 2 y 3 de  $V_k$ ), para crear otras moléculas de unión anti-IFNAR-1 de la invención. La unión de dichos anticuerpos “mezclados y comparados” al IFNAR-1, puede ponerse a prueba usando las pruebas de unión descritas anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo, ELISA). De preferencia, cuando se mezclan y comparan secuencias de CDR de  $V_H$ , la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de  $V_H$  particular es reemplazada con una secuencia de CDR estructuralmente similar. Asimismo, cuando se mezclan y comparan secuencias de CDR de  $V_k$ , la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de  $V_k$  particular es reemplazada de preferencia con una secuencia de CDR estructuralmente similar. Por ejemplo, las CDR1 de 3F11 y 4G5 de  $V_H$  comparten cierta similitud estructural, y por lo tanto están sujetas a mezclado y comparación. Como otro ejemplo, las CDR1 de 11E2 y 9D4 de  $V_H$  comparten cierta similitud estructural, y por lo tanto están sujetas a mezclado y comparación. Como otro ejemplo, las CDR1 de 3F11 y 4G5 de  $V_k$  comparten cierta similitud estructural. Como otro ejemplo, las CDR1 de 11E2 y 9D4 de  $V_H$  comparten cierta similitud estructural. Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica, que pueden crearse secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  novedosas sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR descritas en la presente, para los anticuerpos monoclonales 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4.

En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

- 55 (a) una región variable CDR1 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 1;
- (b) una región variable CDR2 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 5;
- (c) una región variable CDR3 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 9;
- (d) una región variable CDR1 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 13;
- 60 (e) una región variable CDR2 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 17; y
- (f) una región variable CDR3 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 21.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

- 65 (a) una región variable CDR1 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 2;
- (b) una región variable CDR2 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 6;

- (c) una región variable CDR3 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 10;
- (d) una región variable CDR1 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 14;
- (e) una región variable CDR2 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 18; y
- (f) una región variable CDR3 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 22.

5

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una región variable CDR1 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 3;
- (b) una región variable CDR2 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 8;
- (c) una región variable CDR3 de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 12;
- (d) una región variable CDR1 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 16;
- (e) una región variable CDR2 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 20; y
- (f) una región variable CDR3 de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 24.

10

15 Anticuerpos que se unen al mismo epítopo que 3F11, 4G5, 11F2 y 9D4

Anticuerpos que se unen al mismo epítopo en el IFNAR-1 humano como los anticuerpos monoclonales 3F11, 4G5 y 9D4 (que tienen secuencias de  $V_H$  como se muestra en las SEC ID N°: 25, 26 y 28, respectivamente, y secuencias de  $V_L$  como se muestra en las SEC ID N°: 29, 30, 31, 32, respectivamente), pueden identificarse con base en su capacidad para competir en forma cruzada con 3F11, 4G5, 11E2 o 9D4 en pruebas estándar de unión al IFNAR-1. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de 3F11, 4G5 o 9D4 al IFNAR-1 humano, demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con 3F11, 4G5 o 9D4 por la unión al IFNAR-1 humano, y se une de esta manera al mismo epítopo en el IFNAR-1 humano, como 3F11, 4G5 o 9D4. El anticuerpo que se une al mismo epítopo en el IFNAR-1 humano como 3F11, 4G5, 11E2 o 9D4, puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en los ejemplos.

20

25

En otra modalidad preferida, el anticuerpo se une a un epítopo diferente que (es decir, no compite en forma cruzada con) el anticuerpo monoclonal de ratón 64G12 (número de depósito de ECACC 92022605).

30 Anticuerpos que tienen secuencias particulares de la línea germinal

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de la línea germinal particular, y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de la línea germinal particular.

35

Por ejemplo, en una modalidad preferida, la invención provee un anticuerpo monoclonal anti-IFNAR-1 aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

- (a) comprende una región variable de cadena pesada de un gen de  $V_H$  4-34 ó 5-51 humano;
- (b) comprende una región variable de cadena ligera de un gen de  $V_k$  L18 o A27 humano; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente al IFNAR-1.

40

45 Ejemplos de anticuerpos que tienen  $V_H$  y  $V_k$  de  $V_H$  4-34 y  $V_k$  L18, respectivamente, incluyen 3F11 y 4G5. Ejemplos de anticuerpos que tienen  $V_H$  y  $V_k$  de  $V_H$  5-51 y  $V_k$  A27, respectivamente, incluyen 11E2 y 9D4.

50

Como se usa en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena ligera o pesada "de" o "derivadas de" o "el producto de" una secuencia particular de la línea germinal, si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen inmunización de un ratón transgénico que posee genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés, o selección de una colección de genes de inmunoglobulina humana exhibidos en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "de" o "derivado de" o "el producto de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal, comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana, y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que está más cerca en secuencia (es decir, % de identidad más grande) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "de" o "derivado de" o "el producto de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana particular, puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de ocurrencia natural o introducción intencional de mutación dirigida a sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es normalmente por lo menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, y contiene residuos de aminoácido que identifican al anticuerpo humano como de ser humano, cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otra especie (por ejemplo, secuencias de la línea germinal de murino). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser por lo menos 95 %, o incluso por lo menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos, con la secuencia de

55

60

65

aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana particular, exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede exhibir no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

#### Anticuerpos homólogos

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención. Por ejemplo, la invención provee un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°: 25, 26, 27 y 28;

(b) la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N°: 29, 30, 31 y 32;

(c) el anticuerpo se une específicamente al IFNAR-1 y exhibe por lo menos una de las propiedades funcionales descritas en la presente, de preferencia varias de las propiedades funcionales descritas en la presente.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  y/o  $V_L$  pueden ser 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tenga regiones  $V_H$  y  $V_L$  que tengan alta (es decir, 80 % o más) homología con las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de las secuencias expuestas anteriormente, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifiquen para las SEC ID N°: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40, seguida de prueba del anticuerpo alterado codificado para función retenida (es decir, las funciones expuestas en los incisos (c), (d) y (e) anteriores), usando las pruebas funcionales descritas en la presente.

Como se usa en la presente, el por ciento de homología entre dos secuencias de aminoácidos, es equivalente al por ciento de identidad entre las dos secuencias. El por ciento de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del por ciento de identidad entre las dos secuencias, pueden lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos más adelante.

El por ciento de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)), el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de peso de residuos PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el por ciento de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)), el cual se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Además o en forma alternativa, las secuencias de proteínas de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden llevarse a cabo usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10. Pueden realizarse búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con espacios para propósitos de comparación, puede usarse BLAST con espacios como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402. Cuando se usen los programas BLAST y BLAST con espacios, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### Anticuerpos con modificaciones conservativas

Un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos preferidos descritos en la presente (por ejemplo, 3F11, 4G5 y 9D4). Anticuerpos adicionales que

retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención pueden contener modificaciones conservativas de dichas CDR.

5 Como se usa en la presente, el término "modificaciones conservativas de secuencia" se usa para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran en forma significativa las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en el anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos, son aquellas en las cuales el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, uno o más residuos de aminoácido dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención, pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácido de la misma familia de la cadena lateral, y el anticuerpo alterado puede ponerse a prueba para función retenida (es decir, las funciones expuestas en los incisos (c), (d) y (e) anteriores), usando las pruebas funcionales descritas en la presente.

#### Anticuerpos diseñados y modificados

25 Un anticuerpo de la invención puede prepararse además usando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  descritas en la presente como material de partida, para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse modificando uno o más residuos dentro de una de las regiones variables, o ambas (es decir,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR, y/o dentro de una o más regiones marco conservadas. Además o en forma alternativa, un anticuerpo puede diseñarse modificando residuos dentro de las regiones constantes, por ejemplo, para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

35 Un tipo de diseño de la región variable que puede realizarse, es injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácido que se localizan en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena ligera y pesada. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDR. Puesto que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones antígeno-anticuerpo, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos específicos de ocurrencia natural, construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR a partir del anticuerpo de ocurrencia natural específico injertado en secuencias de estructura de un diferente anticuerpo con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 86: 10029-10033; patente de E.U.A. No. 5.225.539 a Winter, y patentes de E.U.A. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a Queen *et al.*).

45 Por consiguiente, otra modalidad de la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo que contiene las secuencias de CDR de  $V_H$  y  $V_L$  de anticuerpos monoclonales 3F11, 4G5 o 9D4, y sin embargo pueden contener diferentes secuencias de estructura de estos anticuerpos.

50 Dichas secuencias de estructura pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas, que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de cadena ligera y pesada, pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en la Internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline  $V_H$  Sequences Reveals about Fifty Groups of  $V_H$  Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line  $V_H$  Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24: 827-836; el contenido de cada una siendo incorporado expresamente en la presente como referencia.

60 Secuencias de estructura preferidas para su uso en los anticuerpos de la invención, son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de estructura por anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias de estructura de  $V_H$  4-34 y  $V_L$  L18 usadas por los anticuerpos monoclonales 3F11 y 4G5, o las secuencias de estructura de  $V_H$  5-51 y  $V_L$  A27 usadas por los anticuerpos monoclonales 11E2 y 9D4. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  de las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_L$  de las SEC ID N°: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24, pueden injertarse en regiones marco conservadas que tengan la misma secuencia que se encuentra en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal de la cual la secuencia de estructura se deriva, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones

marco conservadas que contengan una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos, es benéfico mutar residuos dentro de las regiones marco conservadas para mantener o mejorar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a Queen *et al.*).

5 Otro tipo de modificación de la región variable, es mutar residuos de aminoácido dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de  $V_H$  y/o  $V_L$  para mejorar de esta manera una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Puede realizarse mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir las mutaciones, y el efecto sobre la unión al anticuerpo u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en pruebas *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente y se provee en los ejemplos. De preferencia, se introducen modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son de preferencia sustituciones. Además, normalmente no más de cinco residuos son alterados dentro de una región CDR.

15 Anticuerpos diseñados de la invención, incluyen aquellos en los cuales se han hecho modificaciones a los residuos de estructura dentro de  $V_H$  y/o  $V_L$ , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, dichas modificaciones de estructura se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un procedimiento es "retromutar" uno o más residuos de estructura a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido mutación somática, puede contener residuos de estructura que difieren de la secuencia de la línea germinal de la cual el anticuerpo se deriva. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias de estructura del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la cual el anticuerpo se deriva. Por ejemplo, para 3F11, el residuo de aminoácido #43 (dentro de FR2) de  $V_H$  es una treonina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal de  $V_H$  4-34 correspondiente, es una alanina (véase figura 5). Para regresar las secuencias de la región marco conservada a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, el residuo 43 de la  $V_H$  de 3F11 puede ser "retromutado" de treonina a alanina). Como otro ejemplo, para 4G5, el residuo de aminoácido #81 (dentro de FR3) de  $V_H$  es una asparagina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal de  $V_H$  4-34 correspondiente, es una lisina (véase figura 6). Para regresar las secuencias de la región marco conservada a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" de asparagina a lisina. Como otro ejemplo, para 11E2 y 9D4, el residuo de aminoácido #28 (dentro de FR1) de  $V_H$  es una isoleucina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal de  $V_H$  5-51 correspondiente, es una serina (véase figura 7). Para regresar las secuencias de la región marco conservada a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" de isoleucina a serina. Se pretende también que dichos anticuerpos "retromutados", sean abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación de estructura implica mutar uno o más residuos dentro de la región marco conservada, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para remover epítomos de células T, para reducir de esta manera la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este procedimiento es referido también como "desinmunización", y se describe en más detalle en la publicación de la patente de E.U.A. No. 20030153043 por Carr *et al.*

Además o en forma alternativa a modificaciones hechas dentro de las regiones CDR o de estructura, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más porciones químicas pueden unirse al anticuerpo), o puede modificarse para que se altere su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe en más detalle más adelante. La numeración de residuos en la región Fc, es la del índice EU de Kabat.

50 En una modalidad, la región bisagra de CH1 es modificada, de modo que el número de residuos de cisteína en la región bisagra sea alterado, por ejemplo, incrementado o disminuido. Este procedimiento se describe además en la patente de E.U.A. No. 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 es alterado para, por ejemplo, facilitar el ensamble de las cadenas ligera y pesada, o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

60 En otra modalidad, la región bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos son introducidas en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra-Fc, de modo que el anticuerpo tenga deteriorada la unión a la proteína A estafilocócica (SpA) respecto a la unión a SpA del dominio de bisagra-Fc. Este procedimiento se describe en más detalle en la patente de E.U.A. No. 6.165.745, por Ward *et al.*

65 En otra modalidad, el anticuerpo es modificado para que incremente su vida media biológica. Varios procedimientos son posibles. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de E.U.A. No. 6.277.375 a Ward. En forma alternativa, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítomo

silvestre de unión al receptor, tomado de dos asas de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de E.U.A. Nos. 5.869.046 y 6.121.022, por Presta *et al.*

5 En otras modalidades, la región Fc es alterada reemplazando por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente que altere las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el cual la afinidad es alterada puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este procedimiento se describe en más detalle en las patentes de E.U.A. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, por Winter *et al.*

10 En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 329, 331 y 332 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga alterada la unión a Clq, y/o reducida o suprimida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este procedimiento se describe en más detalle en la patente de E.U.A. No. 6.194.551, por Idusogie *et al.*

15 En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácido dentro de las posiciones de aminoácido 231 y 239, son alterados para alterar de esta manera la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este procedimiento se describe en más detalle en la publicación del PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

20 En otro ejemplo, la región Fc es modificada para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc $\gamma$ , modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Este procedimiento se describe además en la publicación del PCT WO 00/42072 por Presta. Además, los sitios de unión en la IgG1 humana para Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII y FcRn han sido mapeados, y se han descrito variantes con unión alterada (véase Shields, R. L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604). Se mostró que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a Fc $\gamma$ RIII. Además, se mostró que los siguientes mutantes de combinación mejoran la unión a Fc $\gamma$ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

25 En otra modalidad, la glucosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede ser alterada para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácido que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de estructura de la región variable, para eliminar de esta manera la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho procedimiento se describe en más detalle en las patentes de E.U.A. Nos. 5.714.350 y 6.350.861 por Co *et al.*

30 Además o en forma alternativa, puede obtenerse un anticuerpo que tenga un tipo de glucosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosilo, o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNac bisectoras incrementadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Células con maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la técnica, y pueden usarse como células hospedadoras en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de esta manera un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hanai *et al.*, describe una línea de células con un gen de FUT8 funcionalmente disuelto que codifica para una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea de células exhiban hipofucosilación. La publicación del PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea de células CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados por Asn(297), resultando también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740). La publicación del PCT WO 99/54342 por Umana *et al.*, describe líneas de células diseñadas que expresan glucosiltransferasas modificables por glucoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas de células diseñadas exhiban estructuras de GlcNac bisectoras incrementadas que resulten en actividad de ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-180).

35 Otra modificación de los anticuerpos de la presente que es contemplada por la invención, es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado para, por ejemplo, incrementar la vida media biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar normalmente con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos de PEG lleguen a ser unidos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. De preferencia, la pegilación se

lleva a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en la presente, se pretende que el término "polietilenglicol" abarque cualquiera de las formas de PEG que se hayan usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono alcoxi de C1-C10 o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que será pegilado es un anticuerpo aglucosilado. Métodos para la pegilación de proteínas se conocen en la técnica, y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 por Nishimura *et al.* y EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

#### Métodos para el diseño de anticuerpos

De esta manera, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención, por ejemplo, 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4, se usan para crear anticuerpos anti-IFNAR-1 estructuralmente relacionados que retengan por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como unión al IFNAR-1. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 3F11, 4G5, 11E2 o 9D4, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse en forma recombinante con regiones marco conservadas conocidas y/u otras CDR, para crear otros anticuerpos anti-IFNAR-1 diseñados en forma recombinante de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones, incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de diseño, es una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  provistas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  provistas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en las secuencias se usa como el material de partida para crear secuencias de "segunda generación" derivadas de las secuencias originales, y entonces las secuencias de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

Por consiguiente, un método para la preparación dicho anticuerpo anti-IFNAR-1 diseñado comprende:

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de cadena pesada de la invención y (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de cadena ligera de la invención;
- (b) alterar por lo menos un residuo de aminoácido dentro de la primera secuencia de anticuerpo y/o la segunda secuencia de anticuerpo, para crear por lo menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) preparar la secuencia de anticuerpo alterada; y
- (d) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

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

De preferencia, el anticuerpo codificado por la secuencia de anticuerpo alterada, es uno que retenga una de, algunas de, o todas, las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-IFNAR-1 descritos en la presente, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no están limitadas a:

- (i) unión al IFNAR-1;
- (ii) inhibición de la unión de interferones tipo I al IFNAR-1;
- (iii) unión a células vivas que expresan el IFNAR-1 humano;
- (iv) unión al IFNAR-1 humano con una  $K_D$  de  $10^{-8}$  M o menos (por ejemplo,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o menos);
- (v) unión a un epítipo único en el IFNAR-1 (para eliminar la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales con actividades complementarias, cuando se usen en combinación, compitan por la unión al mismo epítipo).

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados, pueden evaluarse usando pruebas estándar disponibles en la técnica y/o descritas en la presente. Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para unirse al IFNAR-1 puede determinarse usando pruebas de unión estándar, tales como las que se exponen en los ejemplos (por ejemplo, ELISA).

En ciertas modalidades de los métodos para el diseño de anticuerpos de la invención, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente o selectivamente a lo largo de una secuencia codificante de anticuerpos anti-IFNAR-1 completa, o parte de la misma (por ejemplo, secuencia codificante de 3F11, 4G5, 11E2 o 9D4), y los anticuerpos anti-IFNAR-1 modificados resultantes pueden seleccionarse para actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describen en la presente. Se han descrito en la técnica métodos mutacionales. Por ejemplo, la publicación del PCT WO 02/092780 por Short, describe métodos para la creación y selección de mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis por saturación, ensamble sintético por ligación, o una combinación de los mismos. En forma alternativa, la publicación del PCT WO 03/074679 por Lazar *et al.*, describe métodos de uso de métodos de selección computacionales, para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

#### Moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención, pertenece a moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células, o en una forma

parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es “aislado” o “se hace que sea sustancialmente puro”, cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por medio de técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/con SDS, patrón de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, o puede contener o no secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas estándar de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados de ratones transgénicos que poseen genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), moléculas de ADNc que codifican para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producido por el hibridoma, pueden obtenerse por medio de técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una colección de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de exhibición de fagos), puede recuperarse de la colección ácido nucleico que codifique para el anticuerpo.

Moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención, son aquellas que codifican para las secuencias de VH y VL de los anticuerpos monoclonales 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4. Secuencias de ADN que codifican para las secuencias de VH y VL de 3F11, se muestran en las SEC ID N<sup>o</sup>: 33 y 37, respectivamente. Secuencias de ADN que codifican para las secuencias de VH y VL de 4G5, se muestran en las SEC ID N<sup>o</sup>: 34 y 38, respectivamente. Secuencias de ADN que codifican para las secuencias de VH y VL de 11E2, se muestran en las SEC ID N<sup>o</sup>: 35 y 39, respectivamente. Secuencias de ADN que codifican para las secuencias de VH y VL de 9D4, se muestran en las SEC ID N<sup>o</sup>: 36 y 40, respectivamente.

Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican para segmentos de VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse además por medio de técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable a genes de la cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes del fragmento Fab o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica para VL o VH es enlazado operativamente a otro fragmento de ADN que codifica para otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. Se pretende que el término “enlazado operativamente”, como se usa en este contexto, signifique que dos fragmentos de ADN se unan de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en la estructura.

El ADN aislado que codifica para la región VH puede ser convertido a un gen de cadena pesada de longitud completa, enlazando operativamente el ADN que codifica para VH a otra molécula de ADN que codifique para regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U. S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH No. 91-3242), y fragmentos de ADN que abarquen estas regiones pueden obtenerse por medio de amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica para VH puede ser enlazado operativamente a otra molécula de ADN que codifique para sólo la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica para la región VL puede ser convertido a un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab), enlazando operativamente el ADN que codifica para VL a otra molécula de ADN que codifique para la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U. S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarquen estas regiones, pueden obtenerse por medio de amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

Para crear un gen de scFV, los fragmentos de ADN que codifican para VH y VL son enlazados operativamente a otro fragmento que codifique para un enlazador flexible, por ejemplo, que codifique para la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias de VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348: 552-554).

#### Producción de anticuerpos monoclonales de la invención

Pueden producirse anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención, mediante varias técnicas, que incluyen metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden usarse otras técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales,



por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para la preparación de hibridomas, es el sistema de murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión, se conocen en la técnica. Se conocen también miembros de fusión (por ejemplo, células de mieloma de murino) y procedimientos de fusión.

Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención, con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal de murino preparado como se describió anteriormente. Puede obtenerse ADN que codifique para las inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada del hibridoma de murino de interés, y pueden diseñarse para que contengan secuencias de inmunoglobulina no de murino (por ejemplo, humano), usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables de murino pueden ser enlazadas a regiones constantes de humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 4.816.567 a Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, pueden insertarse regiones CDR de murino en una estructura de humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 5.225.539 a Winter, y las patentes de E.U.A. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a Queen *et al.*).

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra el IFNAR-1 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcrómicos que posean parte del sistema inmune humano, más que el sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcrómicos incluyen ratones referidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y son referidos en conjunto en la presente como "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican para secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera ( $\kappa$ ) humana no reagrupadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan a los loci de la cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena ligera y pesada humana introducidos, sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgG $\kappa$  humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por dichos ratones, se describe además en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailleon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851.

Véanse además las patentes de E.U.A. Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas a Lonberg y Kay; patente de E.U.A. No. 5.545.807 a Surani *et al.*; publicación del PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas a Lonberg y Kay; y publicación del PCT No. WO 01/14424 a Korman *et al.*

En otra modalidad, pueden producirse anticuerpos humanos de la invención usando un ratón que posea secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcrómicos, tal como un ratón que posea un transgén de cadena pesada humana y un transcrómico de cadena ligera humana. Dichos ratones, referidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación del PCT WO 02/43478 a Ishida *et al.*

Aún más, sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana, están disponibles en la técnica y pueden usarse para producir anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 a Kucherlapati *et al.*

Además, sistemas animales transcrómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana, están disponibles en la técnica y pueden usarse para producir anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones que posean un transcrómico de cadena pesada humana y un transcrómico de cadena ligera humana, referidos como "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Además, vacas que poseen transcrómicos de cadena ligera y pesada humana, se han descrito en la técnica (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894), y pueden usarse para producir anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención.

Pueden prepararse también anticuerpos monoclonales humanos de la invención, usando métodos de exhibición de fagos para la selección de colecciones de genes de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de exhibición de

fagos para el aislamiento de anticuerpos humanos, están establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo: patentes de E.U.A. Nos. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 a Ladner *et al.*; patentes de E.U.A. Nos. 5.427.908 y 5.580.717 a Dower *et al.*; patentes de E.U.A. Nos. 5.969.108 y 6.172.197 a McCafferty *et al.*; y patentes de E.U.A. Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 a Griffiths *et al.*

5 Pueden prepararse también anticuerpos monoclonales humanos de la invención, usando ratones SCID en los cuales se hayan reconstituido células inmunes humanas, de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos. 5.476.996 y 5.698.767 a Wilson *et al.*

#### 10 Inmunización de ratones de Ig humana

15 Cuando se usan ratones de Ig humana para producir anticuerpos humanos de la invención, dichos ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno del IFNAR-1, y/o células que expresen el IFNAR-1, como es descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y publicación del PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. De preferencia, los ratones tendrán de 6 a 16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) de antígeno del IFNAR-1, para inmunizar a los ratones de Ig humana intraperitonealmente. En caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida de antígeno del IFNAR-1 no resulten en anticuerpos, pueden inmunizarse también a los ratones con células que expresen el IFNAR-1, por ejemplo, una línea de células T humanas, para promover respuestas inmunes.

25 Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para el IFNAR-1, se describen en el ejemplo 1 más adelante. La experiencia acumulativa con varios antígenos, ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando inicialmente son inmunizados intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, se encuentra también que adyuvantes diferentes del de Freund, son efectivos. Además, se encuentra que células enteras en ausencia de adyuvante son altamente inmunógenas. La respuesta inmune puede monitorearse durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrías retroorbitales. El plasma puede seleccionarse por medio de ELISA (como se describe más adelante), y ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IFNAR-1 pueden usarse para las fusiones. Los ratones pueden recibir por vía intravenosa un refuerzo de antígeno 3 días antes de su sacrificio y la remoción del bazo. Se espera que pueda necesitarse realizar 2 a 3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones son inmunizados normalmente por cada antígeno. Usualmente, se usan cepas de HCo7 y HCo12. Además, pueden multiplicarse en conjunto transgenes de HCo7 y HCo12 en un sólo ratón que tenga dos diferentes transgenes de cadena pesada humana (HCo7/HCo12).

#### 35 Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

40 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, esplenocitos y/o células de nódulos linfáticos de ratones inmunizados, pueden aislarse y fusionarse con una línea adecuada de células inmortalizadas, como es el caso de una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados, con un sexto del número de células de mieloma de ratón que no secretan P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG. Las células se siembran a aproximadamente  $2 \times 10^5$  en placas de microtítulo de fondo plano, seguido de un período de incubación de dos semanas en medio selectivo que contenga suero de clon fetal a 20 %, medio acondicionado "653" a 18 %, origen a 5 % (IGEN), L-glutamina a 4 mM, piruvato de sodio a 1 mM, HEPES a 5 mM, 2-mercaptoetanol a 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; la HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el cual la HAT sea reemplazada con HT. Cavidades individuales pueden seleccionarse entonces por medio de ELISA, para anticuerpos IgG e IgM monoclonales humanos. Una vez que ocurre crecimiento extensivo del hibridoma, puede observarse el medio usualmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas que secreten anticuerpos pueden sembrarse, seleccionarse de nuevo, y si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por lo menos dos veces por dilución limitativa. Los subclones estables pueden cultivarse entonces *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para caracterización.

60 Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, pueden desarrollarse hibridomas seleccionados en matraces rotatorios de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N. J.). La IgG eluida puede verificarse por medio de electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento para asegurar pureza. La solución de regulador de pH puede intercambiarse en PBS, y puede determinarse la concentración por DO 280, usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden distribuirse en alícuotas, y almacenarse a -80 °C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención

5 Pueden producirse también anticuerpos de la invención en un transfectoma de células hospedadoras usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes, como es bien sabido en la técnica (véase, por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

10 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse moléculas de ADN que codifiquen para cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, por medio de técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés), y las moléculas de ADN pueden insertarse en vectores de expresión, de modo que los genes sean enlazados operativamente a secuencias de control de la transcripción y traducción. En este contexto, se pretende que el término “enlazado operativamente” signifique que el gen del anticuerpo sea ligado en un vector, de modo que secuencias de control de la transcripción y traducción dentro del vector cumplan su función deseada de regulación de la expresión y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o ligación de extremos rasurados si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente, pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo, insertándolos en vectores de expresión que codifiquen ya para regiones constantes de cadena ligera y regiones constantes de cadena pesada del isotipo deseado, de modo que el segmento V<sub>H</sub> sea enlazado operativamente a los segmentos C<sub>H</sub> dentro del vector, y el segmento V<sub>L</sub> sea enlazado operativamente al segmento C<sub>L</sub> dentro del vector. Además o en forma alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar para un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpos de una célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector, de modo que el péptido de señal sea enlazado en el marco de lectura al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina, o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína diferente de inmunoglobulina).

30 Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención poseen secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. Se pretende que el término “secuencia reguladora” incluya promotores, intensificadores u otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlen la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se transformará, el nivel de expresión de la proteína que se desee, etc. Secuencias reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamífero, incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus simiano 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. En forma alternativa, pueden usarse secuencias no reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β-globina. Aún más, pueden usarse elementos reguladores formados de secuencias de diferentes orígenes, tales como el sistema de promotor SRα, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40, y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472).

50 Además de los genes de la cadena del anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden poseer secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las cuales el vector se ha introducido (véase, por ejemplo, patentes de E.U.A. Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la cual el vector se ha introducido. Genes marcadores seleccionables preferidos, incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con amplificación/selección por metotrexato), y el gen neo (para selección por G418).

60 Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican para las cadenas ligera y pesada, son transfectados en una célula hospedadora por medio de técnicas estándar. Se pretende que las varias formas del término “transfección” abarquen una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariótica, por ejemplo, por electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección por DEAE-dextrano, y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y más preferiblemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que es más probable que a diferencia de las células procariotas, dichas células eucarióticas, y en particular 65 células de mamífero, ensamblen y secreten un anticuerpo adecuadamente plgado e inmunológicamente activo. Se

ha informado de que la expresión de genes de anticuerpo en procariontes es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6: 12-13).

Células hospedadoras de mamífero preferidas para la expresión de anticuerpos recombinantes de la invención, incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes GS, descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando vectores de expresión recombinantes que codifican para genes de anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras por un período suficiente que permita la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células hospedadoras están creciendo. Pueden recuperarse anticuerpos del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

#### Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden ponerse a prueba para unión al IFNAR-1, por ejemplo, por medio de ELISA estándar. En resumen, placas de microtítulo se revisten con IFNAR-1 purificado a 0,25 µg/ml en PBS, y se bloquean entonces con albúmina de suero de bovino a 5 % en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados con IFNAR-1) a cada cavidad, y se incuban por 1 a 2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween, y se incuban entonces con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de Fc de IgG anti-humana de cabra) conjugado con fosfatasa alcalina por 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las placas se desarrollan con substrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a DO de 405 a 650. De preferencia, los ratones que desarrollen los títulos más altos, se usarán para las fusiones.

Una prueba de ELISA como se describió anteriormente, puede usarse también para seleccionar para hibridomas que muestren reactividad positiva con inmunógeno del IFNAR-1. Los hibridomas que se unan con alta avidéz al IFNAR-1, son subclonados y caracterizados adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, que retenga la reactividad de las células precursoras (por ELISA), puede seleccionarse para producir un banco de células de 5 a 10 viales almacenados a -140 °C, y para la purificación de anticuerpos.

Para purificar anticuerpos anti-IFNAR-1, pueden desarrollarse hibridomas seleccionados en matraces rotatorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida puede verificarse por electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento, para asegurar pureza. La solución de regulador de pH puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por DO<sub>280</sub> usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden distribuirse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-IFNAR-1 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado usando reactivos disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL). Pueden realizarse estudios de competencia usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados usando placas de ELISA revestidas con el IFNAR-1 como se describió anteriormente. La unión a mAb biotinilado, puede detectarse con una sonda de fosfatasa alcalina-estreptavidina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse pruebas de ELISA de isotipos usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, pueden revestirse las cavidades de placas de microtítulo con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante la noche a 4 °C. Después de bloqueo con BSA a 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente por una a dos horas. Las cavidades pueden hacerse reaccionar entonces con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica de IgM humana o IgG1 humana. Las placas se desarrollan y se analizan como se describió anteriormente.

Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan el IFNAR-1, puede usarse citometría de flujo. En resumen, líneas de células que expresan el IFNAR-1 (desarrolladas bajo condiciones de crecimiento estándar) se mezclan con varias concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS conteniendo BSA a 0,1 % y suero de ternera fetal a 10 %, y se incuban a 37 °C por 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo de IgG anti-humana marcado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que la tinción primaria del anticuerpo. Las muestras pueden analizarse por medio del instrumento FACScan usando las propiedades de dispersión lateral y de luz que regulan células individuales. Puede usarse una prueba alternativa que use microscopía de fluorescencia (además de o en lugar de) la prueba de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente, y pueden examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de las células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida, dependiendo de la densidad del antígeno.

Pueden ponerse a prueba además moléculas de IgG humana anti-IFNAR-1 para reactividad con el antígeno del IFNAR-1, por medio de Western blotting. En resumen, extractos de células de células que expresan el IFNAR-1, pueden prepararse y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternera fetal a 10 %, y se sondan con los anticuerpos monoclonales que se van a poner a prueba. Puede detectarse la unión a la IgG humana usando fosfatasa alcalina de IgG anti-humana, y puede desarrollarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

### Inmunconjugados

En otro aspecto, la presente invención describe un anticuerpo anti-IFNAR-1, o un fragmento del mismo, conjugado con una porción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados son referidos en la presente como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyan una o más citotoxinas, son referidos como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico, incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que las destruya). Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen también, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención, incluyen duocarmicinas, calicamicinas, maytansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo y calicamicina, está disponible comercialmente (Mylotarg™, Wyeth-Ayerst).

Pueden conjugarse citotoxinas con anticuerpos de la invención, usando la tecnología de enlazadores disponibles en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, enlazadores que contengan hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y péptidos. Puede elegirse un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible a digestión por un pH bajo dentro del compartimiento lisosómico o susceptible a digestión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferiblemente en tejido tumoral, tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

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

Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse también con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, referidos también como radioinmunconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso en diagnóstico o terapéutica incluyen, pero no están limitados a, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup> y lutecio<sup>177</sup>. Métodos para la preparación de radioinmunconjugados están establecidos en la técnica. Ejemplos de radioinmunconjugados están disponibles comercialmente, e incluyen Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y métodos similares pueden usarse para preparar radioinmunconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica determinada, y no se considerará que la porción de fármaco se limite a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o el interferón-gamma; o modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, lincocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Técnicas para la conjugación de dicha porción terapéutica con anticuerpos, son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2a. ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future

Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

5 Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención describe moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-IFNAR-1, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, pueden ser derivatizados o enlazados a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor), para generar una molécula biespecífica que se une a por lo menos dos diferentes sitios de unión o moléculas diana. De hecho, el anticuerpo de la invención puede ser derivatizado o enlazado a una o más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos diferentes sitios de unión y/o moléculas diana; se pretende también que dichas moléculas multiespecíficas sean abarcadas por el término "molécula biespecífica", como se usa en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ser enlazado funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una u otras más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que resulte una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión por el IFNAR-1, y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. En una modalidad particular de la invención, el segundo epítipo diana es un receptor Fc, por ejemplo, Fc $\gamma$ R1 (CD64) humano o un receptor Fc $\alpha$  humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse a células efectoras que expresan Fc $\gamma$ R, Fc $\alpha$ R o Fc $\epsilon$ R (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y a células diana que expresan el IFNAR-1. Estas moléculas biespecíficas dirigen células que expresan el IFNAR-1 hacia células efectoras, y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por receptores de Fc, tales como fagocitosis de células que expresan el IFNAR-1, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas, o generación de anión superóxido.

En una modalidad de la invención en la cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-IFNAR-1. En una modalidad, la tercera especificidad de unión es una porción del factor anti-intensificación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en actividad citotóxica, e incrementa de esta manera la respuesta inmune contra la célula diana. La "porción del factor anti-intensificación", puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional, o un ligando que se une a una molécula determinada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y resulta de esta manera en una mejora del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o antígeno de la célula diana. La "porción del factor anti-intensificación" puede unirse a un receptor Fc o el antígeno de una célula diana. En forma alternativa, la porción del factor anti-intensificación puede unirse a una entidad que sea diferente de la entidad a la cual la primera y la segunda especificidades de unión se unen. Por ejemplo, la porción del factor anti-intensificación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, por medio de CD2, CD3, CDB, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulte en una respuesta inmune incrementada contra la célula diana).

En una modalidad, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de la misma e incluye, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo puede ser también un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla, como se describe en Ladner *et al.*, patente de E.U.A. No. 4.946.778, cuyo contenido se incorpora expresamente en la presente como referencia.

En una modalidad, la especificidad de unión por un receptor Fc $\gamma$  es provista por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no sea bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en la presente, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de la cadena  $\gamma$  localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican para un total de 12 isoformas del receptor soluble o de transmembrana que se agrupan en tres clases del receptor Fc $\gamma$ : Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). En una modalidad preferida, el receptor Fc $\gamma$  es un Fc $\gamma$ RI humano de alta afinidad. El Fc $\gamma$ RI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad por la IgG monomérica ( $10^8$  -  $10^9$  M<sup>-1</sup>).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc $\gamma$  preferidos, son descritas por Fanger *et al.* en la publicación del PCT WO 88/00052, y en la patente de E.U.A. No. 4.954.617, cuyas enseñanzas se incorporan enteramente en la presente como referencia. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII o Fc $\gamma$ RIII en un sitio que sea distinto del sitio de unión a Fc $\gamma$  del receptor y, de esta manera, su unión no es bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI específicos útiles en esta invención, son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible de The American Type Culture Collection, número de acceso de ATCC HB9469. En otras modalidades, el anticuerpo del receptor anti-

Fc $\gamma$  es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R. F. *et al.* (1995) *J. Immunol* **155** (10): 4996-5002, y en la publicación del PCT WO 94/10332. La línea de células que producen el anticuerpo H22, fue depositada en The American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1, y tiene el número de acceso CRL 11177.

5 En otras modalidades preferidas, la especificidad de unión por un receptor Fc es provista por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc $\alpha$ RI (CD89)), cuya unión es de preferencia no bloqueada por la inmunoglobulina A (IgA) humana. Se pretende que el término "receptor de IgA", incluya el producto génico de un gen  $\alpha$  (Fc $\alpha$ RI) localizado en el cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar para varias isoformas de transmembrana alternativamente empalmadas de 55 a 110 kDa. El Fc $\alpha$ RI (CD89) es expresado constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. El Fc $\alpha$ RI tiene afinidad media ( $\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) por IgA1 e IgA2, la cual se incrementa tras la exposición a citocinas tales como el G-CSF o el GM-CSF (Morton, H. C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* **16**: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc $\alpha$ RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc $\alpha$ RI fuera del dominio de unión al ligando de la IgA (Monteiro, R. C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* **148**: 1764).

20 El Fc $\alpha$ RI y el Fc $\gamma$ RI son receptores desencadenantes preferidos para su uso en las moléculas biespecíficas de la invención, porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median la presentación mejorada de antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos hacia ellos.

25 Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden usarse en las moléculas biespecíficas de la invención, son anticuerpos monoclonales de murino, quiméricos y humanizados.

30 Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-IFNAR-1, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado, y puede conjugarse entonces con alguna otra. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede usarse varios agentes de acoplamiento o de entrelazamiento para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrelazamiento incluyen proteína A, carbodiimida, S-acetil-tioacetato de N-succinimidilo (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) de N-succinimidilo, y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* **160**: 1686; y Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* **229**: 81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**: 2367-2375). Agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

40 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse por medio de unión por enlaces sulfhidrilo a las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una modalidad particularmente preferida, la región bisagra es modificada para que contenga un número impar de residuos sulfhidrilo, de preferencia uno, antes de la conjugación.

45 En forma alternativa, ambas especificidades de unión pueden ser codificadas en el mismo vector, y pueden expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil en donde la molécula biespecífica es una proteína de fusión de mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprenda un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas de cadena sencilla. Métodos para la preparación de moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la patente de E.U.A. número 5.260.203; patente de E.U.A. número 5.455.030; patente de E.U.A. número 4.881.175; patente de E.U.A. número 5.132.405; patente de E.U.A. número 5.091.513; patente de E.U.A. número 5.476.786; patente de E.U.A. número 5.013.653; patente de E.U.A. número 5.258.498; y patente de E.U.A. número 5.482.858.

55 La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse, por ejemplo, por medio de prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis por FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o prueba Western Blot. Cada una de estas pruebas detecta en general la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular, usando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo ligado a enzima o fragmento de anticuerpo que reconozca y se una específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. En forma alternativa, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una otros diversos inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986, cita que se

incorpora en la presente como referencia). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo, o por autorradiografía.

#### Composiciones farmacéuticas

5 En otro aspecto, la presente invención provee una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una combinación de anticuerpos monoclonales, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir un anticuerpo o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unan a diferentes epítomos en el antígeno diana, o que tengan actividades complementarias.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también en terapia de combinación, es decir, pueden combinarse con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la presente invención, combinado con por lo menos algún otro agente inmunosupresor.

20 Como se usa en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. De preferencia, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede revestirse en un material que proteja al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar al compuesto.

25 Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. El término una "sal farmacéuticamente aceptable", se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor, y no imparte efecto toxicológico no deseado alguno (véase, por ejemplo, Berge, S. M. *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**: 1-19). Ejemplos de dichas sales incluyen sales ácidas de adición y sales básicas de adición. Las sales ácidas de adición incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales básicas de adición incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína, y similares.

40 Una composición farmacéutica de la invención puede incluir también un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, como es el caso de ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

45 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención, incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de agentes tensioactivos.

50 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse por medio de procedimientos de esterilización, citados anteriormente, y por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. Puede ser también deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse por la inclusión de agentes que retarden la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

60 Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas, se conoce en la técnica. Excepto hasta donde algún medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Pueden incorporarse también compuestos activos complementarios en las composiciones.

65



Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de agentes tensioactivos. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente adecuado con un ingrediente o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración con esterilización. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son, secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que dé un polvo del ingrediente activo más algún ingrediente deseado adicional de una solución filtrada del mismo previamente estéril.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará, dependiendo del sujeto que se esté tratando, y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual, será en general aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, de entre 100 por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 99 por ciento de ingrediente activo, de preferencia de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, puede administrarse varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente, según sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación, para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión forma de unidad de dosificación, como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se tratarán; cada unidad contiene una unidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por, y depende directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se logrará, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinación de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedero. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o dentro de la escala de 1-10 mg/kg. Un ejemplo de régimen de tratamiento acarrea la administración de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la invención, incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por medio de administración intravenosa, siendo administrado el anticuerpo usando uno de los siguientes planes de dosificación: (i) cada cuatro semanas por seis dosificaciones, entonces cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez, seguidos de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de las escalas indicadas. El anticuerpo se administra usualmente en ocasiones múltiples. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares, según se indica midiendo los niveles del anticuerpo en sangre para el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml, y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

En forma alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían, dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de

administración pueden variar, dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente no frecuentes, durante un período largo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere a veces hasta que la progresión de la enfermedad sea reducida o terminada, y de preferencia hasta que el paciente muestre mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. Después, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden hacerse variar hasta obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención usadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, la hora de administración, la rapidez de excreción del compuesto particular que se esté usando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares usadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la invención, resulta de preferencia en una disminución en severidad de síntomas de enfermedad, un incremento en frecuencia y duración de períodos libres de síntomas de enfermedad, o una prevención de deterioro o incapacidad debida a la aflicción por la enfermedad. En el caso de, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LSE), una dosis terapéuticamente efectiva previene de preferencia más deterioro de síntomas físicos asociados con el LSE tales como, por ejemplo, dolor, fatiga o debilidad. Una dosis terapéuticamente efectiva previene o retarda también de preferencia el inicio del LSE, tal como puede desearse cuando están presentes signos tempranos o preliminares de la enfermedad. Asimismo, incluye el retardo de la progresión crónica asociada con el LSE. Pruebas de laboratorio usadas en el diagnóstico del LSE, incluyen químicas, hematología, serología y radiología. Por consiguiente, cualquier prueba clínica o bioquímica que monitoree cualquiera de lo anterior, puede usarse para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente efectiva para el tratamiento del LSE. El experto en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades con base en factores tales como la estatura del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionadas.

Una composición de la presente invención puede administrarse por medio de una o más vías de administración, usando uno o más de varios métodos conocidos en la técnica. Como lo apreciarán los expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán, dependiendo de los resultados deseados. Vías de administración preferidas para los anticuerpos de la invención, incluyen las vías intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se usa en la presente, significa modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, e infusión.

En forma alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse por medio de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o a través de mucosas, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

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

Pueden administrarse composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las patentes de E.U.A. Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención, se incluyen en la patente de E.U.A. No. 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para la dispensación de medicación a un régimen controlado; la patente de E.U.A. No. 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; la patente de E.U.A. No. 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para el suministro de medicación a un régimen de infusión preciso; la patente de E.U.A. No. 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; la patente de E.U.A. No. 4.439.196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármaco que tiene compartimientos de cámaras múltiples; y la

patente de E.U.A. No. 4.475.196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármaco. Estas patentes se incorporan en la presente como referencia. Muchos otros de dichos implantes, sistemas de suministro y módulos, son conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea) pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que sean transportadas selectivamente en células u órganos específicos, mejorando de esta manera el suministro dirigido de fármacos (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Ejemplos de porciones de direccionamiento, incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 5.416.016 a Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína A - agente tensoactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; e I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

#### Usos y métodos de la invención

- 20 Los anticuerpos (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la presente invención, tienen utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar varios trastornos. Se pretende que el término "sujeto", como se usa en la presente, incluya animales humanos y no humanos. Animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante o inadecuada de interferón tipo I (por ejemplo, sobreexpresión).

- 30 Cuando los anticuerpos para el IFNAR-1 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en orden o simultáneamente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la invención puede usarse en combinación con uno o más de los siguientes agentes: anticuerpo anti-IFN $\alpha$ , anticuerpo del receptor anti-IFN $\gamma$ , receptor de IFN $\gamma$  soluble, anticuerpo anti-FNT, anticuerpo del receptor anti-FNT, y/o receptor de FNT soluble (véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 5.888.511). Además, un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la invención puede usarse en combinación con un antagonista del ligando Flt3 (véase, por ejemplo, la solicitud de E.U.A. No. 2002/0160974).

- 40 En una modalidad, los anticuerpos (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la invención pueden usarse para detectar niveles del IFNAR-1, o niveles de células que expresan el IFNAR-1. Esto puede lograrse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra control con el anticuerpo anti-IFNAR-1 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y el IFNAR-1. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y el IFNAR-1 es detectado y comparado en la muestra y el control. Por ejemplo, pueden realizarse métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y pruebas de citometría de flujo, usando las composiciones de la invención.

- 45 Por consiguiente, en un aspecto, la invención provee además métodos para la detección de la presencia del IFNAR-1 (por ejemplo, antígeno del IFNAR-1 humano) en una muestra, o la medición de la cantidad del IFNAR-1, que comprenden poner en contacto la muestra y una muestra control con un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al IFNAR-1, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y el IFNAR-1. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada y la muestra control, es indicativa de la presencia del IFNAR-1 en la muestra.

- 55 También dentro del alcance de la invención, están equipos que comprenden las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, anticuerpos humanos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la invención, e instrucciones para su uso. El equipo puede contener además por lo menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se una a un epítipo en el antígeno diana distinto del primer anticuerpo). Los equipos incluyen normalmente una etiqueta que indique el uso deseado de los contenidos del equipo. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado provisto sobre o con el equipo, o que de otra manera acompaña al equipo.

- 60 El IFNAR-1 forma parte del receptor celular para interferones tipo I, y los interferones tipo I son conocidos por ser citocinas inmunorreguladoras que están implicadas, entre otras cosas, en diferenciación de células T, producción de anticuerpos y actividad y supervivencia de células T de memoria. Además, la expresión incrementada de interferones tipo I se ha descrito en numerosas enfermedades autoinmunes, en infección por VIH, en rechazo de trasplante y en enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD). Por consiguiente, los anticuerpos anti-IFNAR-1 (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la invención, que inhiben la actividad funcional de interferones tipo

I, pueden usarse en varias indicaciones clínicas que implican actividad de interferón tipo I aberrante o no deseada. Por lo tanto, la invención provee los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la invención para su uso en un método para la inhibición de una enfermedad o trastorno mediado por interferón tipo I, en donde el método comprende la administración de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención (o inmunoconjugado o molécula biespecífica de la invención), de modo que la enfermedad o trastorno mediado por interferón tipo I, sea tratado.

Ejemplos específicos de condiciones autoinmunes en las cuales los anticuerpos de la invención pueden usarse incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes: lupus eritematoso sistémico (LSE), diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (que incluye enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enfermedad celíaca), esclerosis múltiple (MS), psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide (RA) y glomerulonefritis. Además, las composiciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para la inhibición o prevención del rechazo de trasplante, o en el tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), o en el tratamiento de infección por VIH/SIDA.

Altos niveles de IFN $\alpha$  se han observado en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LSE) (véase, por ejemplo, Kim *et al.* (1987) *Clin. Exp. Immunol.* 70: 562-569). Además, se ha mostrado que la administración de IFN $\alpha$ , por ejemplo, en el tratamiento de cáncer o infecciones virales, induce LSE (García-Porrúa *et al.* (1998) *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 107-108). Por consiguiente, en otra modalidad, los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención pueden usarse en el tratamiento de LSE, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-LSE, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), analgésicos, corticoesteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inmunosupresores (tales como ciclofosfamida, azatioprina y metotrexato), antipalúdicos (tales como hidroxicloquina), y fármacos biológicos que inhiben la producción de anticuerpos de ADN de doble cadena (por ejemplo, LJP 394).

El IFN $\alpha$  se ha implicado también en la patología de diabetes tipo I. Por ejemplo, se ha informado de la presencia de IFN $\alpha$  inmunorreactivo en células beta pancreáticas de pacientes con diabetes tipo I (Foulis *et al.* (1987) *Lancet* 2: 1423-1427). Se ha mostrado también que el uso prolongado de IFN $\alpha$  en terapia antiviral, induce diabetes tipo I (Waguri *et al.* (1994) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 23: 33-36). Por consiguiente, en otra modalidad, los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención pueden usarse en el tratamiento de diabetes tipo I, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antidiabéticos, tales como insulina.

Se ha mostrado que los anticuerpos para el IFNAR son efectivos en un modelo animal de enfermedad inflamatoria del intestino (véase la solicitud de patente de E.U.A. 60/465.155). De esta manera, los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino (EII), que incluye colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-EII, tales como fármacos que contienen mesalamina (incluyendo sulfasalazina y otros agentes que contengan ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), tales como olsalazina y balsalazida), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), analgésicos, corticoesteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inhibidores del FNT (incluyendo adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) e infliximab (Remicade®)), inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, azatioprina y ciclosporina A), y antibióticos.

Se ha observado también que el tratamiento con IFN $\alpha$  induce tiroiditis autoinmune (Monzani *et al.* (2004) *Clin. Exp. Med.* 3: 199-210; Prummel y Laurberg (2003) *Thyroid* 13: 547-551). Por consiguiente, en otra modalidad, los anticuerpos anti-IFNAR de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedad tiroidea autoinmune, que incluye hipotiroidismo autoinmune primario, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto y tiroiditis destructiva con hipotiroidismo, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes o tratamientos, tales como fármacos antitiroideos, yodo radiactivo y tiroidectomía subtotal.

Se han observado niveles incrementados de interferones tipo I, especialmente IFB- $\beta$ , en el suero de pacientes con RA (véase, por ejemplo, Hertzog *et al.* (1988) *Clin. Immunol. Immunopath.* 48: 192). De esta manera, en una modalidad, los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de RA, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de dicho tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con uno o más de otros agentes anti-RA, tales como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un inhibidor de COX-2, un analgésico, un corticoesteroide (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), oro, un inmunosupresor (por ejemplo, metotrexato), un agente de depleción de células B (por ejemplo, Rituxan<sup>TM</sup>), un agonista de células B (por ejemplo, LymphoStat-B<sup>TM</sup>) y un agente anti-FNT- $\alpha$  (por ejemplo, EMBREL<sup>TM</sup>, HUMIRA® y REMICADE<sup>TM</sup>).

Se ha informado de que la administración de IFN $\alpha$  exacerba la psoriasis. Por consiguiente, en otra modalidad, los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención pueden usarse en el tratamiento de psoriasis y artritis psoriática, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de dicho tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en

combinación con uno o más de otros agentes antipsoriasis, tales como fototerapia, terapia tópica (por ejemplo, glucocorticoides tópicos) o terapia sistémica (por ejemplo, metotrexato, retinoide sintético, ciclosporina), un agente anti-FNT- $\alpha$  (por ejemplo, EMBREL™, HUMIRA® y REMICADE™), y un inhibidor de células T (por ejemplo, Raptiva™).

5 Se han observado también altos niveles de IFN $\alpha$  en la circulación de pacientes con infección por VIH, y su presencia es un marcador profético de progresión del SIDA (DeStefano *et al.* (1982) *J. Infec. Disease* **146**: 451; Vadhan-Raj *et al.* (1986) *Cancer Res.* **46**: 417). De esta manera, en otra modalidad, un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la invención se usa en el tratamiento de infección por VIH o SIDA, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesita de  
10 tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-VIH, tales como inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósidos, inhibidores de transcriptasa inversa no de nucleósidos, inhibidores de proteasa e inhibidores de fusión.

15 Se ha demostrado que los anticuerpos para el IFNAR-1, son efectivos para inhibir el rechazo de aloinjertos y prolongar la supervivencia del aloinjerto (véase, por ejemplo, Tovey *et al.* (1996) *J. Leukoc. Biol.* **59**: 512-517; Benizri *et al.* (1998) *J. Interferon Cytokine Res.* **18**: 273-284). Por consiguiente, los anticuerpos anti-IFNAR-1 de la invención pueden usarse también en receptores de trasplante para inhibir el rechazo de aloinjertos y/o prolongar la supervivencia del aloinjerto. La invención provee un método para inhibir el rechazo de trasplante, administrando un anticuerpo anti-IFNAR-1 de la invención a un receptor de trasplante que necesita de tratamiento. Ejemplos de  
20 trasplantes de tejidos que pueden tratarse incluyen, pero no están limitados a, hígado, pulmón, riñón, corazón, intestino delgado y células de los islotes pancreáticos, así como el tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD). El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes para inhibir el rechazo de trasplante, tales como agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, mofetil micofenolato, sirolimus, rapamicina, tacrolimus), agentes antiinfecciosos (por  
25 ejemplo, aciclovir, clotrimazol, ganciclovir, nistatina, trimetoprima y sulfametoxazol), diuréticos (por ejemplo, bumetanida, furosemida, metolazona) y medicaciones contra la úlcera (por ejemplo, cimetidina, famotidina, lanzoprazol, omeprazol, ranitidina, sucralfato).

30 La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben considerarse como limitativos de la invención como se define en las reivindicaciones.

### **Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra el IFNAR-1**

#### Antígeno

35 Se generó IFNAR-1 soluble, que contiene al dominio extracelular del IFNAR-1, mediante métodos recombinantes, y se usó como antígeno para inmunización.

#### Ratones HuMab transgénicos

40 Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos para el IFNAR-1, usando las cepas HCo7, HCo12 y HCo7 x HCo12 de ratones transgénicos HuMab, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón ha sido disuelto homocigóticamente, como se describe en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**: 811-820, y el gen endógeno de la  
45 cadena pesada de ratón ha sido disuelto homocigóticamente como se describe en el ejemplo 1 de la publicación del PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón posee un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851. La cepa HCo7 posee el transgén de la cadena pesada humana HCo7, como se describe en las patentes de E.U.A. Nos. 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa HCo12 posee el transgén de la cadena pesada humana HCo12, como se describe en el ejemplo 2 de la  
50 publicación del PCT WO 01/09187. La cepa HCo7 x HCo12 posee los transgenes de HCo7 y HCo12, y se obtuvo cruzando las dos cepas.

#### Inmunización de ratones HuMab

55 Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para el IFNAR-1, se inmunizó a ratones HuMab con IFNAR-1 recombinante purificado como antígeno. Esquemas generales de inmunización para ratones HuMab, se describen en Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* **368** (6474): Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851, y la publicación del PCT WO 98/24884. Los ratones tenían de 6 a 16 semanas de edad, tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (5-50  $\mu$ g) de antígeno del IFNAR-1 soluble, para  
60 inmunizar a los ratones HuMab intraperitonealmente, subcutáneamente (Sc) o por medio de inyección en el cojinete de la pata.

Se inmunizó dos veces a los ratones transgénicos con antígeno, en adyuvante completo de Freund o adyuvante de Ribí, ya sea intraperitonealmente (IP), subcutáneamente (Sc) o por medio de inyección en el cojinete de la pata (FP), seguido de inmunización IP, Sc o FP por 3 a 21 días (hasta un total de 11 inmunizaciones), con el antígeno en  
65 adyuvante incompleto de Freund o adyuvante de Ribí. La respuesta inmune se monitoreó por medio de sangrías

retroorbitales. El plasma se seleccionó por ELISA (como se describe más adelante), y se usaron para las fusiones ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IFNAR-1. Los ratones recibieron un refuerzo con antígeno por vía intravenosa 3 y 2 días antes de su sacrificio y la remoción del bazo. Normalmente, se realizaron 10 a 35 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias docenas de ratones por cada antígeno.

5

#### Selección de ratones HuMab que producen anticuerpos anti-IFNAR-1

Para seleccionar ratones HuMab que producen anticuerpos que se unen al IFNAR-1, se pusieron a prueba sueros de ratones inmunizados por medio de ELISA, como es descrito por Fishwild, D. *et al.* (1996). En resumen, se revistieron placas de microtítulo con IFNAR-1 recombinante purificado de *E. coli* a 1-2 µg/ml en PBS, 50 µl/cavidades incubadas a 4 °C durante la noche, y bloqueadas entonces con 200 µl/cavidad de suero de pollo a 5 % en PBS/Tween (0,05 %). Se añadieron a cada cavidad diluciones de plasma de ratones inmunizados con el IFNAR-1, y se incubaron por 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron entonces con un anticuerpo policlonal de Fc de IgG anti-humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), por 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml), y se analizaron por espectrofotómetro a DO de 415 a 495. Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-IFNAR-1, se usaron para las fusiones. Se realizaron fusiones como se describe más adelante, y se pusieron a prueba los sobrenadantes del hibridoma para actividad anti-IFNAR-1 por medio de ELISA.

10

#### Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para el IFNAR-1

Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMab, fueron fusionados con PEG a una línea de células de mieloma de ratón basada en protocolos estándar. Los hibridomas resultantes se seleccionaron entonces para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Se fusionaron suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados, con una cuarta parte del número de células de mieloma de ratón que no secretaban SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG a 50 % (Sigma). Las células se sembraron a aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> células/cavidad en placas de microtítulo de fondo plano, seguido de casi dos semanas de incubación en medio selectivo que contenía suero de bovino fetal a 10 %, medio acondicionado P388D1 a 10 % (ATCC, CRL TIB-63), origen a 3 a 5 % (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alto contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más HEPES a 5 mM, 2-mercaptoetanol a 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y 1xHAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1 a 2 semanas, las células se cultivaron en medio en el cual la HAT fue reemplazada con HT. Las cavidades individuales se seleccionaron entonces por medio de ELISA (descrita anteriormente) para anticuerpos de IgG monoclonales anti-IFNAR-1 humanos. Una vez que ocurrió el crecimiento extensivo de hibridomas, el medio se monitoreó usualmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas que secretaban anticuerpos se sembraron, se seleccionaron de nuevo y, si aún eran positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-IFNAR-1 fueron subclonados por lo menos dos veces por dilución limitativa. Los subclones estables se cultivaron entonces *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para más caracterización.

25

30

35

40 Se seleccionaron los clones de hibridoma 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 para más análisis.

#### **Ejemplo 2: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales humanos 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4**

45 Las secuencias de ADNc que codifican para las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4, se obtuvieron de los hibridomas 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4, respectivamente, usando técnicas estándar de PCR, y se secuenciaron usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.

50 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 3F11 se muestran en la figura 1A y en SEC ID N°: 33 y 25, respectivamente.

50

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3F11 se muestran en la figura 1B y en SEC ID N°: 37 y 29, respectivamente.

55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 3F11 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena pesada de 3F11 usa un segmento VH de VH 4-34 de la línea germinal humana, un segmento D indeterminado, y un segmento JH de JH 6b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VH de 3F11 con la secuencia de VH 4-34 de la línea germinal, se muestra en la figura 5. Otro análisis de la secuencia de VH de 3F11 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, como se muestra en las figuras 1A y 5 y en las SEC ID N°: 1, 5 y 9, respectivamente.

60

65 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 3F11 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena ligera de 3F11 usa un segmento VL de VK L18 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK5 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VL de 3F11 con la secuencia de VK L18 de la línea germinal, se muestra en la figura 8. Otro análisis de la secuencia de VL de 3F11 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó

65

al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, como se muestra en las figuras 1B y 8 y en las SEC ID N°: 13, 17 y 21, respectivamente.

5 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 4G5 se muestran en la figura 2A y en SEC ID N°: 34 y 26, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 4G5 se muestran en la figura 2B y en SEC ID N°: 38 y 30, respectivamente.

10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 4G5 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena pesada de 4G5 usa un segmento VH de VH 4-34 de la línea germinal humana, un segmento D indeterminado, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VH de 4G5 con la secuencia de VH 4-34 de la línea germinal, se muestra en la figura 6. Otro análisis de la secuencia de VH de 4G5 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, como se muestra en las figuras 2A y 6 y en las SEC ID N°: 2, 6 y 10, respectivamente.

20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 4G5 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena ligera de 4G5 usa un segmento VL de VK L18 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK2 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VL de 4G5 con la secuencia de VK L18 de la línea germinal, se muestra en la figura 9. Otro análisis de la secuencia de VL de 4G5 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, como se muestra en las figuras 2B y 9 y en las SEC ID N°: 14, 18 y 22, respectivamente.

25 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 11E2 se muestran en la figura 3A y en SEC ID N°: 35 y 27, respectivamente.

30 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 11E2 se muestran en la figura 3B y en SEC ID N°: 39 y 31, respectivamente.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 11E2 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena pesada de 11E2 se derivó del segmento VH de VH 5-51 de la línea germinal humana (o es altamente similar al mismo), un segmento D indeterminado, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VH de 11E2 con la secuencia de VH 5-51 de la línea germinal, se muestra en la figura 7. Otro análisis de la secuencia de VH de 11E2 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, como se muestra en las figuras 3A y 7 y en las SEC ID N°: 3, 7 y 11, respectivamente.

40 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 11E2 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena ligera de 11E2 usa un segmento VL de VK A27 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK5 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VL de 11E2 con la secuencia de VK A27 de la línea germinal, se muestra en la figura 10. Otro análisis de la secuencia de VL de 11E2 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, como se muestra en las figuras 3B y 10 y en las SEC ID N°: 15, 19 y 23, respectivamente.

50 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 9D4 se muestran en la figura 4A y en SEC ID N°: 36 y 28, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 9D4 se muestran en la figura 4B y en SEC ID N°: 40 y 32, respectivamente.

55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 9D4 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena pesada de 9D4 se derivó del segmento VH de VH 5-51 de la línea germinal humana (o es altamente similar al mismo), un segmento D indeterminado, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia de VH de 9D4 con la secuencia de VH 5-51 de la línea germinal, se muestra en la figura 7. Otro análisis de la secuencia de VH de 9D4 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, como se muestra en las figuras 4A y 7 y en las SEC ID N°: 4, 8 y 12, respectivamente.

65 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 9D4 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana, demostró que la cadena ligera de 9D4 usa un segmento VL de VK A27 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK5 de la línea germinal humana. La

alineación de la secuencia de VL de 9D4 con la secuencia de VK A27 de la línea germinal, se muestra en la figura 10. Otro análisis de la secuencia de VL de 9D4 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR, llevó al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, como se muestra en las figuras 3B y 10 y en las SEC ID N<sup>o</sup>: 16, 20 y 24, respectivamente.

5 **Ejemplo 3: Los anticuerpos monoclonales humanos anti-IFNAR-1, inhiben la actividad biológica del interferón  $\alpha$ 2b**

10 La línea de células de Daudi, derivada de un linfoma de Burkitt de linfoblastos B humanos, expresa altos niveles del IFNAR-1, y el crecimiento de estas células es inhibido por los interferones tipo I. Para medir la capacidad de bloqueo funcional de los anticuerpos anti-IFNAR-1 humanos se realizaron dos pruebas diferentes, una prueba de proliferación de células y una prueba de indicador.

15 En la primera prueba, las células de Daudi se cultivaron con interferón  $\alpha$ 2b en presencia o ausencia de anticuerpos, y se midió la proliferación por captación de <sup>3</sup>[H]-timidina. Las células de Daudi (ATCC CCL-213) se desarrollaron en RPMI que contenía FCS a 10 % y beta-mercaptoetanol a 2 mM (medio). Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio con albúmina de suero humano a 1 % añadida (medio y HS). A cada cavidad de una placa de 96 cavidades, se añadieron 100  $\mu$ l de 200 U/ml de interferón  $\alpha$ 2b (Schering Corporation) que contenía la concentración adecuada de anticuerpos. Se añadieron a las cavidades 100  $\mu$ l de células de Daudi en medio y HS, y las placas se incubaron por 48 horas a 37 °C. Las placas se pulsaron con 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>[H]-timidina y se incubaron por otras 24 horas. Las placas se cosecharon, se colectaron sobre una placa con filtro de fibra de 96 cavidades, y se contaron usando un contador de centelleo TopCount (Packard). Los conteos por minuto se graficaron como una función de la concentración de anticuerpos, y los datos se analizaron por regresión no lineal, respuesta a la dosis sigmoidal (pendiente variable), usando el software Prism (San Diego, CA).

25 En la segunda prueba, se transfectó a células U937 con una construcción en la cual un elemento de respuesta estimulado por interferón fue enlazado a un gen indicador (ISRE-RG), y se midió la capacidad de los anticuerpos anti-IFNAR-1 humanizados para bloquear la expresión del gen indicador inducida por el IFN. Las células se desarrollaron en RPMI que contenía FCS a 10 % y beta-mercaptoetanol a 2 mM (medio). Las células ( $1 \times 10^6$  células/ml) se resuspendieron en el medio con suero humano a 2 % añadido. Se añadieron 100  $\mu$ l de las células a una placa de 96 cavidades. Los anticuerpos se diluyeron en serie en medios que contenían 200 U/ml de interferón  $\alpha$ 2b (Schering Corporation), y se añadieron 100  $\mu$ l a cada cavidad. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. Después de esta incubación, se evaluó la expresión del gen indicador por citometría de flujo. Se graficó la intensidad de fluorescencia media geométrica como una función de la concentración de anticuerpos, y los datos se analizaron por regresión no lineal, respuesta a la dosis sigmoidal (pendiente variable), usando el software Prism (San Diego, CA).

40 Mediante el uso de las dos pruebas descritas anteriormente, se comparó la potencia del anticuerpo monoclonal humano 3F11 con el anticuerpo anti-IFNAR-1 de murino 64G12 (número de depósito de ECACC 92022605), y con el anticuerpo anti-IFNAR-1 humanizado DI H3K1 (descrito además en el documento de E.U.A. número de serie 60/465.058). La potencia de 3F11 mostró una potencia 5 a 10 veces mayor que el anticuerpo de ratón, y una potencia 6 a 30 veces mayor que el anticuerpo humanizado. Los resultados se resumen en el cuadro 1 siguiente:

**Tabla 1 Capacidad de bloqueo del anticuerpo anti-IFNAR-1 humano sobre el IFN alfa 2b**

	Isotipo	Proliferación de células (Daudi) CE <sub>50</sub> (nM)	Indicador ISRE-RG (U937) CE <sub>50</sub> (nM)
64G12	m IgG1	3,1	6,0
DI H3K1	h IgG1	9,3	8,0
3F11	h IgG1	0,3	1,2

45 **Ejemplo 4: Los anticuerpos monoclonales humanos anti-IFNAR-1 inhiben la actividad biológica del IFN omega**

50 Mediante el uso de la prueba de proliferación de células de Daudi descrita anteriormente en el ejemplo 3, se puso a prueba la capacidad de los anticuerpos anti-IFNAR-1 humanos para inhibir las respuestas del IFN omega. A cada cavidad de una placa de 96 cavidades, se añadieron 100  $\mu$ l de 200 U/ml de interferón omega (PBL) que contenía la concentración adecuada de anticuerpos. Los anticuerpos humanos 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 fueron 4 a 18 veces más potentes (según se mide por CE<sub>50</sub>), que el anticuerpo 64G12 de ratón. Los resultados se resumen en el cuadro 2 siguiente:

55



**Tabla 2 Capacidad de bloqueo del anticuerpo anti-IFNAR-1 humano sobre el IFN omega**

	Isotipo	Proliferación de células (Daudi) CE <sub>50</sub> (nM)
64G12	m IgG1	5,5
DI H3K1	h IgG1	30,7
3F11	h IgG1	0,6
4G5	h IgG1	1,4
11E2	h IgG1	0,3
9D4	h IgG1	0,3

**Ejemplo 5: Los anticuerpos monoclonales humanos anti-IFNAR-1 inhiben la actividad biológica de IFN tipo I múltiples**

5

Como se describió en el ejemplo 3, el interferón alfa inhibe la proliferación de células de Daudi (linfoma de Burkitt, ATCC # CCL-213) en una forma dependiente de la dosis. Un anticuerpo neutralizante, que bloquee la unión del interferón a su receptor, restaurará la proliferación. Mediante el uso de esta prueba de proliferación de células, se examinó la especificidad de los anticuerpos anti-IFN alfa humanos purificados, mediante la realización de pruebas para el bloqueo de IFN $\alpha$  linfoblastoide natural, interferón natural de leucocitos, 13 subtipos de IFN alfa recombinante, IFN beta e IFN omega.

10

15

20

25

Se desarrollaron células de Daudi en medio de cultivo (RPMI 1640 complementado con FCS a 10 %, 1 x 2-ME, L-glutamina y penicilina-estreptomocina) con y sin la adición de IFN $\alpha$  en una placa de cultivo de células de 96 cavidades de fondo plano. Cada interferón tipo I se puso a prueba a CE<sub>50</sub>, y se mezcló con una titulación gradual doble de anticuerpo anti-IFNAR-1 3F11, normalmente de 50  $\mu$ g/ml (312 nM) a 381 pg/ml (2,4 pM). La mezcla de anticuerpos/IFN se añadió a las células de Daudi en una placa de 96 cavidades de fondo plano a una densidad final de  $1 \times 10^4$  de células de Daudi/100  $\mu$ l/cavidad, y se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 %, por 72 horas. Se puso a prueba la proliferación con la adición de MTS (Promega), 20  $\mu$ l/cavidad, y se midió la DO a 490 nm después de otras 3 horas de incubación. El número de células viables fue proporcional a la lectura de DO. Se calculó el porcentaje de bloqueo del interferón respecto a la proliferación de células de Daudi en ausencia de IFN (=100 % de bloqueo) y en presencia de IFN solo (=0 % de bloqueo). El anticuerpo 3F11 se evaluó de acuerdo al grado de bloqueo, resultando en un perfil de especificidad del subtipo de IFN $\alpha$ . Los resultados demostraron que el anticuerpo del receptor 1 anti-interferón alfa humano 3F11, inhibe la acción de subtipos múltiples de interferón alfa, que incluyen IFN $\alpha$  6, 2b, 2a, 1, 16, 10, 8, 5, 14, 17, 7, 4 y 21, así como IFN linfoblastoide, IFN de leucocitos e IFN omega. 3F11 es un inhibidor de menor nivel de IFN beta, aunque se observó inhibición mayor de 50 %. El % de bloqueo y la desviación estándar del interferón, se muestran en el cuadro 3 siguiente:

**Tabla 3 Inhibición de interferones tipo I múltiples por anticuerpos**

Bloqueo del IFN por 3F11 ( %) a 1000 x Ab		
IFN	media	desviación estándar
IFN linfoblastoide	94,9	2,9
IFN $\alpha$ 6	107,1	6,6
IFN $\alpha$ 2b	101,9	0,4
IFN $\alpha$ 2a	103,1	3,0
IFN $\alpha$ 1	111,6	1,9
IFN de leucocitos	109,4	1,4
IFN $\alpha$ 16	105,7	1,4
IFN $\alpha$ 10	96,7	5,5
IFN $\alpha$ 8	87,5	2,6
IFN $\alpha$ 5	105,1	3,9
IFN $\alpha$ 14	100,3	1,4
IFN $\alpha$ 17	99,8	2,4
IFN $\alpha$ 7	102,8	3,2
IFN $\alpha$ 4	100,5	2,5
IFN $\alpha$ 21	104,4	2,3
IFN-beta	53,0	1,7
IFN-omega	107,1	1,3

30

**Ejemplo 6: Inhibición de la secreción de IP-10 inducida por IFN por anticuerpos anti-IFNAR-1**

35

Se ha mostrado que la adición de IFN alfa 2b a medios de cultivo de células, induce la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) normales. La actividad del anticuerpo anti-IFNAR-1 humano 3F11 se puso a prueba para la inhibición de la secreción de IP-10 inducida por interferón, por cultivos de PBMNC

normales mediante una prueba de unión por ELISA.

Se incubaron PBMNC en medio de cultivo (RPMI 1640 + FBS a 10 % + suero humano a 10 %) con IFN de leucocitos, IFN alfa 2b o IFN  $\omega$  por 24 a 48 horas. Se colectaron sobrenadantes, y se analizaron para concentración de IP-10/CXCL10 usando un equipo de ELISA en sándwich cuantitativa (Quantikine®, R&D Systems) a una dilución 1:30, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los resultados demostraron que el anticuerpo monoclonal humano 3F11 inhibe la secreción de IP-10 inducida por IFN de leucocitos, IFN $\alpha$ 2b recombinante e IFN $\omega$  recombinante, por el cultivo de células PBMNC normales. Estos resultados se muestran en el cuadro 4:

**Tabla 4 Inhibición por anticuerpos, de la expresión de IP-10 inducida por IFN en PBMNC normales**

Tratamiento con Ab	Sin IFN IP-10 (pg/ml)	IFN de leucocitos IP-10 (pg/ml)	IFN alfa 2b IP-10 (pg/ml)	IFN omega IP-10 (pg/ml)
Sin anticuerpo	907	2665	2739	2904
3F11 (5 $\mu$ g/ml)	387	854	745	674
Ig control (5 $\mu$ g/ml)	838	3512	3117	3960

Se añadieron 100 U/ml de cada subtipo de IFN a los cultivos.

#### **Ejemplo 7: Prueba de competencia cruzada de anticuerpos monoclonales humanos anti-IFNAR-1**

Para evaluar si los anticuerpos monoclonales humanos se unen al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 64G12 de ratón, se usó una prueba de ELISA de competencia cruzada para determinar si los anticuerpos competían por el mismo epítipo de unión.

Se revistieron placas de 96 cavidades con IFNAR-1 humano soluble derivado de células CHO, a una concentración de 1  $\mu$ g/mL en DPBS recién preparado a 100  $\mu$ l/cavidad (Mediatech). Se añadieron anticuerpos monoclonales humanos 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4 a 20  $\mu$ g/mL a las cavidades de la columna 1, y se diluyeron en serie a una relación 1:2 en las cavidades de la columna 1 a la columna 12, seguido de incubación por 45 minutos. Se añadió anticuerpo monoclonal de ratón 64G12, a una concentración  $CE_{75}$  de 0,3  $\mu$ g/mL, a 50  $\mu$ L por cavidad, y las placas se incubaron por 30 minutos. Las placas se lavaron tres veces con el lavador automático de placas Elx 405 (BIO-TEK Instruments). Un anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra de F(ab')<sub>2</sub> purificado por afinidad y peroxidasa (específico de Fc $\gamma$ ) se diluyó 1:3000 en PBS, y se añadió como el conjugado de detección (Jackson ImmunoResearch Laboratories, no. de catálogo 115-036-0710). Después de una hora de incubación, las placas se lavaron 3 veces con el lavador automático de placas Elx 405. Una solución de ABTS (existencia de 800  $\mu$ l de ABTS, 8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % y 100 mL de regulador de pH de fosfato-citrato) a 27,8 mg/mL se añadió a cada cavidad, y se incubó por 20 minutos. Las placas se leyeron a 415 nm usando 490 nm como longitud de onda de referencia. Los resultados se muestran en la figura 11. Los resultados demostraron que los anticuerpos monoclonales anti-IFNAR-1 humanos, 3F11, 4G5, 11E2 y 9D4, no compiten con 64G12 por la unión al IFNAR-1, y de esta manera se unen a un epítipo diferente en el IFNAR-1 que 64G12.

#### **Ejemplo 8: Inhibición por anticuerpos, del desarrollo de células dendríticas mediado por plasma del LSE**

El plasma del LSE induce desarrollo de células dendríticas a partir de monocitos humanos normales. En este ejemplo, el anticuerpo anti-IFNAR-1 humano monoclonal purificado, 3F11, se puso a prueba para la inhibición del desarrollo de células dendríticas, y se evaluó por la capacidad de los anticuerpos para inhibir la inducción de marcadores de superficie celular CD38, MHC clase I y CD123, por plasma del LSE.

Se diluyeron 25 ml de cubierta amarilla cuatro veces con PBS. La muestra se separó en tubos cónicos de 4 x 50 ml, y se estratificaron bajo los mismos 15 ml de medio de separación de linfocitos (ICN Biomedicals). Después de centrifugación por 30 minutos a 500 x g, la cubierta amarilla que contenía a los PBMC se removió, y se lavó con PBS. Las células se resuspendieron en medio de cultivo a 4 x 10<sup>6</sup> células/ml. Los monocitos se aislaron incubando PBMC (2,0 x 10<sup>7</sup> células/5 ml/matraz de 25 cm<sup>2</sup>) por 1,5 horas a 37 °C en medio de cultivo, y entonces arrastrando con el lavado dos veces las células no adherentes. Después del segundo lavado, las células se cultivaron en medios que contenían suero humano a 1 % inactivado con calor. Se añadieron a los matraces de cultivo 25 % de plasma de pacientes con LSE más/menos anticuerpos neutralizantes y controles de isotipos (30  $\mu$ g/ml): se usó IFN alfa 2b (100 y 10 U/ml) más plasma humano normal a 25 %, como control positivo para la inducción de marcadores. Los matraces se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 %, por tres a siete días. El medio acondicionado se cosechó de cada matraz, y las células en suspensión se recuperaron por centrifugación a 1000 rpm en un rotor Sorvall RTH-750. Las células transformadas a pellas se retuvieron sobre hielo, y el sobrenadante se congeló a -80 °C para ELISA. Las células adherentes se removieron del matraz con un lavado en PBS (2 ml), seguido de 15 minutos de incubación en versene (3 ml), de ser necesario. El matraz se raspó al final de la incubación en versene, y se enjuagó finalmente con PBS (2 ml). Cada uno de los lavados en PBS y el versene se combinaron con las células recuperadas de la cosecha del medio acondicionado. La suspensión de células agrupadas se centrifugó a 1000 rpm en un rotor Sorvall RTH-750, y la pella resultante se resuspendió en 300  $\mu$ l en regulador de pH de tinción (PBS + EDTA a 0,1 M + FBS a 2 % + HS a 1 %), y se dispensaron 100  $\mu$ l/cavidad en una placa de 96 cavidades de fondo en V. La placa se

centrifugó por impulsos a 2800 rpm en un rotor Sorvall RTH-750, y las células transformadas a pellas se resuspendieron 25 µl/cavidad en anticuerpos marcados con fluorocromo, de la manera siguiente: (1) anti-MHC I-FITC de ratón + anti-CD38-PE de ratón, y (2) controles de isotipos, IgG-FITC de ratón + IgG-PE de ratón. La placa se incubó en hielo por 45 minutos, y se protegió de la luz. Las células se lavaron tres veces con la adición de 200 µl de regulador de pH de tinción, seguido de centrifugación por impulsos, y finalmente se resuspendieron en 200 µl de paraformaldehído a 2 % en PBS. La tinción de células dendríticas se analizó por citometría de flujo con el FACScalibur™ de Becton Dickinson. Se trazaron compuertas en la gráfica de dispersión hacia delante contra dispersión lateral, para remover las células contaminantes del análisis. El anticuerpo monoclonal humano anti-IFNAR-1 3F11 inhibe el proceso de desarrollo de células dendríticas dependiente de IFN alfa, según se demuestra por la expresión normalizada de marcadores de superficie celular MHC clase I, CD38 y CD123 en presencia de 3F11. Los resultados se muestran a continuación en el cuadro 5, en donde (A) y (B) resumen los resultados de dos muestras representativas de donadores con LSE.

**CUADRO 5**  
**Inhibición de la maduración de células dendríticas**

(A)		Plasma del donador #40* (13,3 UI/mL**)		
		MHC clase I	CD123	CD38
Condiciones de cultivo		MFI	MFI	MFI
0 IFN/mL		148	14	40
10 IFN/mL		200	19	44
100 IFN/mL		229	26	63
0		206	22	47
3F11		115	13	32
HulG1 (control de isotipos)		194	22	62

(B)		Plasma del donador #59* (75,3 UI/mL**)		
		MHC clase I	CD123	CD38
Condiciones de cultivo		MFI	MFI	MFI
0 IFN/mL		229	11	58
10 IFN/mL		271	12	86
100 IFN/mL		294	13	112
0		202	15	62
3F11		112	8	22
HulG1 (control de isotipos)		266	14	55

**Ejemplo 9: Análisis de Scatchard de la unión de anticuerpos humanos anti-IFNAR-1 a células de Daudi o células mononucleares de sangre periférica humanas**

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica humanas a partir de sangre fresca por medio de protocolos estándar, usando separación con Ficol. Se obtuvieron células de Daudi de ATCC, y se desarrollaron en RPMI que contenía suero de bovino fetal (FBS) a 10 %. Las células se lavaron dos veces con RPMI que contenía FBS a 10 % a 4 grados, y las células se ajustaron a  $4 \times 10^7$  células/ml en medio del RPMI que contenía suero de bovino fetal a 10 % (regulador de pH de unión). Se revistieron placas Millipore (MAFB NOB) con leche desgrasada en polvo a 1 % en agua, y se almacenaron a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron con regulador de pH de unión, y a las cavidades control se añadieron 25 µl de anticuerpo no marcado (exceso de 1000 veces) en regulador de pH de unión, en una placa con filtro de fibra de vidrio de 96 cavidades Millipore (NBS de unión no específica). Se añadieron veinticinco microlitros de regulador de pH solo a la cavidad control de unión máxima (unión total). Se añadieron veinticinco microlitros de concentración variable de anticuerpo <sup>125</sup>I-anti-IFNAR-1 y 25 µl de células de Daudi o células mononucleares de sangre periférica humanas ( $4 \times 10^7$  células/ml) en regulador de pH de unión. Las placas se incubaron por 2 horas a 200 RPM en un agitador a 4 °C. Al término de la incubación, las placas Millipore se lavaron dos veces con 0,2 ml de regulador de pH de unión frío. Los filtros se removieron y se contaron en un contador gamma. Se realizó evaluación de la unión en equilibrio usando parámetros de unión de sitio individual con el software Prism (San Diego, CA).

Mediante el uso de la prueba de Scatchard de unión anterior, la K<sub>D</sub> del anticuerpo para células de Daudi y para células mononucleares de sangre periférica humanas, fue de aproximadamente 0,2 nM y 0,5 nM, respectivamente.

ES 2 526 194 T3

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID Nº:	SECUENCIA	SEC ID Nº:	SECUENCIA
1	VH CDR1 a.a. 3F11	21	VK CDR3 a.a. 3F11
2	VH CDR1 a.a. 4G5	22	VK CDR3 a.a. 4G5
3	VH CDR1 a.a. 11E2	23	VK CDR3 a.a. 11E2
4	VH CDR1 a.a. 9D4	24	VK CDR3 a.a. 9D4
5	VH CDR2 a.a. 3F11	25	VH a.a. 3F11
6	VH CDR2 a.a. 4G5	26	VH a.a. 4G5
7	VH CDR2 a.a. 11E2	27	VH a.a. 11E2
8	VH CDR2 a.a. 9D4	28	VH a.a. 9D4
9	VH CDR3 a.a. 3F11	29	VK a.a. 3F11
10	VH CDR3 a.a. 4G5	30	VK a.a. 4G5
11	VH CDR3 a.a. 11E2	31	VK a.a. 11E2
12	VH CDR3 a.a. 9D4	32	VK a.a. 9D4
13	VK CDR1 a.a. 3F11	33	VH n.t. 3F11
14	VK CDR1 a.a. 4G5	34	VH n.t. 4G5
15	VK CDR1 a.a. 11E2	35	VH n.t. 11E2
16	VK CDR1 a.a. 9D4	36	VH n.t. 9D4
17	VK CDR2 a.a. 3F11	37	VK n.t. 3F11
18	VK CDR2 a.a. 4G5	38	VK n.t. 4G5
19	VK CDR2 a.a. 11E2	39	VK n.t. 11E2
20	VK CDR2 a.a. 9D4	40	VK n.t. 9D4
41	VH 4-34 línea germinal a.a.		
42	VH 5-51 línea germinal a.a.		
43	VK L18 línea germinal a.a.		
44	VK A27 línea germinal a.a.		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor 1 de interferón alfa humano (IFNAR-1), en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde las secuencias de CDR1, CDR3 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en:
  - 10 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 1; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 5; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 9; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 13; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 17; y
  - 15 una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 21.
  - (b) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 2; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 6; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 10; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 14; y
  - 20 una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 18; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 22; y
  - (c) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 4; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 8; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 12;
  - 25 una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 16; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 20; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 24.
- 30 2. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de un gen de V<sub>H</sub> 4-34 o 5-51 humano.
3. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de un gen V<sub>K</sub> L18 o A27 humano.
- 35 4. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de un gen V<sub>K</sub> L18 o A27 humano.
5. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones 2 o 4, el cual comprende una región variable de cadena pesada de un gen V<sub>H</sub> 4-34 humano y una región variable de cadena ligera de un gen V<sub>K</sub> L18 humano.
- 40 6. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones 2 o 4, el cual comprende una región variable de cadena pesada de un gen V<sub>H</sub> 5-51 humano y una región variable de cadena ligera de un gen V<sub>K</sub> A27 humano.
- 45 7. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, el cual comprende:
  - 50 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 1;
  - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 5;
  - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 9;
  - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 13;
  - (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 17;
  - y
  - 55 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 21.
8. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, el cual comprende:
  - 60 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 2;
  - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 6;
  - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 10;
  - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 14;
  - 65 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N<sup>o</sup>: 18;
  - y

- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 22.
9. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, el cual comprende:
- 5 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 4;  
 (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 8;  
 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 12;  
 10 (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 16;  
 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 20;  
 y  
 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 24.
- 15 10. El anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión antígeno del mismo, de la reivindicación 1, el cual comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en:
- 20 (a) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 25; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 29;  
 (b) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 26; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 30; y  
 (c) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 28; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 32.
- 25 11. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 10, el cual comprende:
- 30 (a) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 25; y  
 (b) una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 29.
12. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 10, el cual comprende:
- 35 (a) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 26; y  
 (b) una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 30.
13. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 10, el cual comprende:
- 40 (a) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 28; y  
 (b) una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 32.
14. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se une al receptor 1 de interferón alfa humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o mayor afinidad.
- 45 15. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a receptor 1 de interferón alfa humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o mayor afinidad.
- 50 16. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, inhibe la actividad biológica de IFN- $\beta$ .
- 55 17. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, inhibe la actividad de IFN omega en un ensayo de proliferación de células de Daudi.
- 60 18. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, inhibe la actividad biológica de múltiples interferones de tipo I.
- 65 19. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, inhibe la actividad de IFN $\alpha$ 2b en un ensayo de proliferación de células de Daudi.

20. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo inhibe la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica inducida por IFN $\alpha$ 2b.
- 5 21. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, inhibe la secreción de IP-10 por células mononucleares de sangre periférica inducida por IFN omega.
- 10 22. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, inhibe el desarrollo de células dendríticas mediado por plasma de lupus eritematoso sistémico.
- 15 23. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se une al receptor 1 de interferón alfa humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menor.
24. Una composición que comprende al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 25. Un inmunocombinado que comprende al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, unido a un agente terapéutico.
26. El inmunocombinado de la reivindicación 25 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 27. El inmunocombinado de la reivindicación 25, en donde el agente terapéutico es una citotoxina.
28. El inmunocombinado de la reivindicación 27 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 29. El inmunocombinado de la reivindicación 25, en donde el agente terapéutico es un isótopo radiactivo.
- 30 30. El inmunocombinado de la reivindicación 29 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
31. Una molécula biespecífica que comprende al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión distinta a la de dicho anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.
- 35 32. Una composición que comprende la molécula biespecífica de la reivindicación 31, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 33. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
34. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 33.
- 45 35. Una célula hospedadora que comprende al vector de expresión de la reivindicación 34.
36. Un ratón transgénico que comprende transgenes de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana, en donde el ratón expresa el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
- 50 37. Un hibridoma preparado a partir del ratón de la reivindicación 36, en donde el hibridoma produce dicho anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.
- 55 38. Un método *in vitro* para inhibir la actividad biológica de un interferón tipo I en una célula que expresa receptor 1 de interferón alfa que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, de tal forma que se inhibe la actividad biológica del interferón tipo I.
- 60 39. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno mediados por interferón de tipo I en un sujeto que necesite tratamiento, en donde la enfermedad o el trastorno se seleccionan del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide y glomerulonefritis, VIH (o SIDA), y rechazo de trasplante (o enfermedad de injerto contra hospedador).
- 65 40. Uso del anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno mediados por interferón tipo I en un

sujeto que necesite tratamiento, en donde la enfermedad o el trastorno se seleccionan del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide y glomerulonefritis, VIH (o SIDA), y rechazo de trasplante (o enfermedad de injerto contra hospedador).

5



VH DE 3F11 ANTI-IFNAR  
 SEGMENTO V: 4-34  
 SEGMENTO D: INDETERMINADO  
 SEGMENTO J: JM58

```

1   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
    CAG GTG CAG CTA GAG CAG TCC GCC GCA GCA CTG TTG AAG CCT TCT GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
35  S L T C A V Y G G S F S G Y F W S W
    TCC CTC ACC TGC GCT CTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT CCT TAT TTC TGG ACC TGG

                                CDR2
                                -----
109 Y R Q P P G R G L E W I G E I D R S
    ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAC GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CAC ACT

                                CDR2
                                -----
163 G R T N Y N P S L K S R V T I S V D
    GGA AAG ACC AAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA CTT ACC ATA TCA GTA GAC

217 T S K N Q V S L K L S S V T A A D T
    ACC TCC AAG AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG ACC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACC

                                CDR3
                                -----
271 A V Y Y C A R E S K Y Y E G L D V W
    GCT GTG TAT TAC TGT GCC AGA CAA AGC AAG TAC TAC TTC GGT TGG GAC GTC TGG

325 G Q G T T V T V T S
    GCC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC ACC TCA
    
```

FIGURA 19

UK DE 3F1: ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: L18

SEGMENTO J: JK5

```

1   A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
-----
35  V T I T C R A S Q G I Y S V L A W Y
   GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT TAC ACT GGT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
-----
109 Q Q K F G K T E K L L I Y D A S R L
   CAG CAG AAA CCA GGC AAA ACT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GGC TCC GGT TTG

                                CDR2
-----
163 E S G V F S R F S G S G S G T D F T
   GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

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

                                CDR3
-----
271 F N S Y I T F G Q G T R L E I K
   TTT AAT AGT TAC ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

FIGURA 18

WHIDE 4G5 ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: 4-34  
 SEGMENTO D: INDETERMINADO  
 SEGMENTO J: JH4b

```

1   Q V Q L Q Q W G A G L L K F S E T L
    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55  S L T C A V Y G G S F S N Y Y W S W
    TCC CTC ACC TCC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC ACT AAT TAC TAC TGG ACC TGG

                                CDR2
                                -----
109 I R Q P P G K G L E W I G E I I L S
    ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG CCG CTC GAG TGG ATT GGG GAA ATC ATT CTT AGT

                                CDR2
                                -----
163 G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
    GGA ACC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG ACT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

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

                                CDR3
                                -----
271 A V Y Y C A R E S K W G Y Y F D S W
    GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TCT AAA TGG GGT TAC TAC TTT GAC TCC TGG

325 G Q G T L V T V S S
    GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC CTC TCC TCA
    
```

FIGURA 2A

VK-DE 465 ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: L18  
 SEGMENTO J: JK2

```

1   A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
    GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55  V I I T C R A T Q D I S I A L V W Y
    GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA ACT CAG GAG ATT AGC ATT GCT TTA GTC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P G K A P E L L I Y D A S G L
    CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT GAG ETC CTG ATC TAT GAT GCC TCC GGT TTG

    CDR2
    -----
163 G S G V P S R F S G S G S G T D P T
    GGA AGT GGG GTC CCA TCA AGC TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

    CDR3
    -----
271 F N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
    TTT AAT ACT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTC GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 2B

VH SW 11E2 ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: 5-51  
 SEGMENTO D: INDETERMINADO  
 SEGMENTO J: JH4b

```

1   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
    GAG CTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA CAG CTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTC

                                CDR1
                                -----
55  K Y S C K S S C Y I F T N Y W I A W
    AAG ATC TCC TGT AAG CGT TCT GGA TAC ATC TTT ACC AAT TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q M P G K G L E S N C I I Y P G
    GTG CGC CAG ATG CCC GGT AAA GGC CTG GAC TCG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163 E S D I K Y S F S F Q G Q V T I S A
    GAC TCT GAT ATC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217 D K S I T T A Y L Q W S S L K A S D
    GAC AAG TCC ATC ACC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGT CTG AAG GCC TCA GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A M Y Y C R R H D I E G F D Y W G
    ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GAC ATA GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC

325 R G T L V T V S S
    CGC GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 3A

VK DE 11E2 ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: A27

SEGMENTO:J: JK5

```

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

                                     CDR1
-----
      A T L S C R R S Q S V S S S F F A W
55  CCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC ACT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTC GCC TGG

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

      CDR2
-----
      R A T G I P D R L S G S G S G T D F
163 ACC GCC ACT GGC ATC CCA CAC AGG TTA AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

      CDR3
-----
      Q Y D S S A I T F G Q G T R L E I K
271 CAG TAT GAT ACC TCA GCG ATC ACC TTC GCC CAA CCG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
    
```

FIGURA 3B

VH DE 904 ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: 5-51  
 SEGMENTO D: INDETERMINADO  
 SEGMENTO J: JH4b

```

1      E V Q L V Q S C A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTC GTC CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAC CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
55     K I S C K C S E Y I F T N Y W I A W
      AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ATC TTT ACC AAC TAC TGG ATC CCC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q H P G K C L E S M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGT AAA GGC CTG GAG TCG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163    D S D I R Y S F S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ATC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GGC

217    D K S I T T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCG ATC ACC ACC GCC TAC CTG CAG TGG ACC AGT CTG AAG GCC TCA GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A M Y Y C A R R D I E G F P D Y W G
      ACC GCC ATG TAT TAC GGT CCG AGA CAT GAC ATA GAG GGG TTT CAC TAC TGG GGC

325    R G T L V T V S S
      CGG GCA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 4A

VK DE 9D4 ANTI-IFNAR

SEGMENTO V: A27

SEGMENTO J: JK5

```

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

                                CDR1
-----
55  A T L S C R R S Q S V S S S P F A W
   GCC ACC CTC TCC TGC AAG GGC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AAG TTC TTC CCC TGG

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

   CDR2
-----
163 R A T C I P D R L S G S G S G T D F
   ACG GCC AAT GCC ATC CCA GAC AGG TTA AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

   CDR3
-----
271 Q Y D S S A I T F G Q G T R L E I K
   CAC TAT GAT AGC TCA GCG ATC ACC TTC GCC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

FIGURA 4B



REGION VH DE-3F11 ANTI-IFNAR

CDR1  
4-34 LINEA GERMINAL: Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y S  
G S F S G Y Y W S W I R Q F  
VH DE 3F11: - - - - -  
- - - - - F - - - - -

CDR2  
4-34 LINEA GERMINAL: P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R  
V T I S Y D T S K N Q F S L  
VH DE 3F11: - - - - - D - - - K - - - - -  
- - - - - V - -

CDR3  
4-34 LINEA GERMINAL: K L S S V T A A D T A V Y Y C A R  
VH DE 3F11: - - - - - E S K Y Y F G L D  
V W G Q G T T V T V I S

FIGURA 5

REGION VH DE 4G5 ANTI-IFNAR

4-34 LINEA GERMINAL QVQLQQW GAGLLKPS ETL S L T C A V Y G CDR1  
G S F S G Y Y W S W I R Q P  
VH DE 4G5 -----  
- - - - N - - - - -

4-34 LINEA GERMINAL: P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N F S L K S R CDR2  
V T I S V D T S K N Q F S L  
VH 4G5 : ----- I L -----  
- - - - -

CDR3  
4-34 LINEA GERMINAL: K L S S V T A A D T A V Y Y C A R  
VH DE 4G5: N - T - - - - - E S R W G Y Y F D  
S W C Q G T L V T V S S

FIGURA 6

REGIONES VH DE 11E2 Y 9D4 ANTI-IFNAR

5-51 LINEA GERMINAL: E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C CDR1  
 Y S P T S Y W I G W V R D M P  
 VH DE 11E2: - - - - -  
 - I - - N - - - A - - - - -  
 VH DE 9D4: - - - - -  
 - I - - N - - - A - - - - -

5-51 LINEA GERMINAL: G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q CDR2  
 V T I S A D K S I S T A Y L Q  
 VH DE 11E2: - - - - - S - - - - - I - - - - -  
 - - - - - T - - - - -  
 VH DE 9D4: - - - - - S - - - - - I - - - - -  
 - - - - - T - - - - -

5-51 LINEA GERMINAL: W S S L K A S D T A M Y Y C A R CDR3  
 - - - - - H D I E G F D Y W G  
 R G T L V T V S S  
 VH DE 9D4: - - - - -  
 - - - - -

FIGURA 7

REGION VK DE 3F11 ANTI-IFNAR

CDR1  
L18 LINEA GERMINAL: A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R  
A S Q G I S S A L A W Y  
VK DE 3F11: - - - - -  
- - - - - Y - V - - - - -

CDR2  
L18 LINEA GERMINAL: Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S  
R F S G S G S G T D F T  
VK DE 3F11: - - - - - T - - - - - R - - - - -  
- - - - -

CDR3  
L18 LINEA GERMINAL: L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P  
VK DE 3F11: - - - - - I T  
F G Q G T R L E I K

FIGURA 8

ES 2 526 194 T3

REGION VK DE 4G5 ANTI-IFNAR

```

                                CDR1
L18 LINEA GERMINAL:  A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S
Q G I S S A L A W Y Q Q K P
VK DE 4G5:          - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T
- D - - I - - V - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

```

```

                                CDR2
L18 LINEA GERMINAL:  G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R Y S G S G
S G T D F T L T I S S L Q P
VK DE 4G5:          - - - - E - - - - - - - G - G - - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

```

```

                                CDR3
L18 LINEA GERMINAL:  E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
VK DE 4G5:          - - - - - - - - - - - - - - - - - Y T F G Q G T K L E I

```

FIGURA 9

REGION VK DE 11E2 Y 904-ANTI-IFNAR

CDR1

A27 LINEA GERMINAL: E I V L T Q S P G T L S L S P C E R A T L S C R A S  
 Q S V S S S Y L A W Y Q Q R P  
 VK DE 11E2: - - - - -  
 VK DE 904: - - - - - F F - - - - -  
 - - - - - F F - - - - -

CDR2

A27 LINEA GERMINAL: G Q A P R L L I Y C A S S R A T G I P D R F S G S G  
 S C T D P T L T I S R L E P E  
 VK DE 11E2: - - - - - L - - - - -  
 - - - - - T - - - - -  
 VK DE 904: - - - - - L - - - - -  
 - - - - - T - - - - -

CDR3

A27 LINEA GERMINAL: D F A V Y Y C Q Q Y G S S P  
 VK DE 11E2: - - - - - D - - A I T F G Q G T R L E I R  
 VK DE 904: - - - - - D - - A - - - - -

FIGURA 10

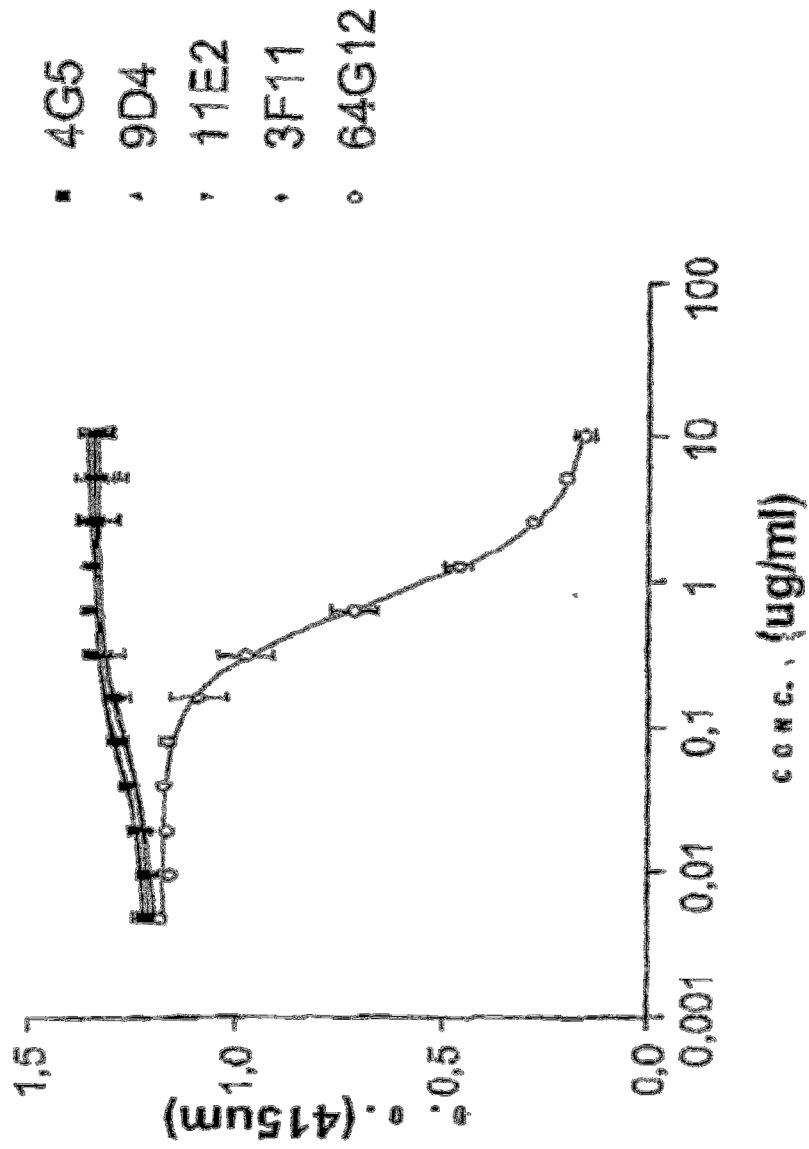


FIGURA 11