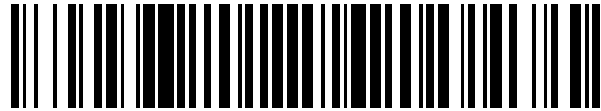


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 262**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2011** **E 11746573 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2609117**

54 Título: **Anticuerpos contra la IL-18R1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**25.08.2010 EP 10174039**

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

**07.12.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BRANDT, MICHAEL;**  
**FISCHER, JENS;**  
**JENEWEIN, STEFAN;**  
**KALUZA, KLAUS;**  
**SEEBER, STEFAN y**  
**SAMY, EILEEN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 553 262 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la IL-18R1 y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos contra la IL-18R1 humana (anticuerpos de IL-18R1 o anticuerpo de IL-18R $\alpha$ ), a anticuerpos que no se unen al factor del complemento C1q, a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

IL-18 es un miembro de la superfamilia de las citoquinas IL-1. Es un regulador importante de la inmunidad innata y adaptativa y presenta efectos sinérgicos con IL-2, induciendo la diferenciación del linaje Th1/Tc1, induce la maduración de las células T y NK, estimula la producción de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF, regula la acumulación, función y apoptosis celular de macrófagos y neutrófilos, y contribuye a las respuestas de Th2 mediante la estimulación de la producción de IgE y la diferenciación de Th2 en presencia de IL-4 ó IL-2. El receptor de IL-18 (IL-18R1) consiste de subunidades de unión de ligando (IL-18R1) y de transducción de señales (IL-18R1) (revisados en Nakanishi K. *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 19:423-474, 2001).

15

20

IL-18 aparentemente modula la inflamación en múltiples puntos de control y se considera una diana terapéutica potencial. Algunos estudios anteriores han demostrado que las células T IFN $\alpha$  y CD8 desempeñan una o más funciones importantes en la patogénesis del enfisema pulmonar (Grumelli S. *et al.*, PLoS Medicine 1:75-83, 2004; Ma *et al.*, J. Clin. Invest. 115:3460-3472, 2005; Wang Z. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1587-1599, 2000; Sutherland y Cherniack, N. Engl. J. Med. 350:2689-2697, 2004). IL-18 desempeña un papel importante en la diferenciación del linaje Th1/Tc1 y en la producción de citoquinas (Hoshino *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 176:49-62, 2007). En un modelo murino, el humo del tabaco (HT) induce y activa la IL-18 en ratones, IL-18R1 $\alpha$  desempeña un papel crucial en la patogénesis e inflamación y destrucción alveolar inducidas por el HT (Kang M.J. *et al.*, J. Immunol. 178:1948, 2007; Kang M.J., J. Clin. Invest. 118:2771, 2008).

25

30

La IL-18R1 humana (receptor 1 de la interleuquina 18, IL-18R $\alpha$ , miembro A de la familia de tipo antígeno CD218, CD218a, UniProtKB/Swiss-Prot Q13478, SEC ID n° 72) es un receptor de la interleuquina 18 (IL-18) y una proteína membranal de tipo I de paso único. La unión a la agonista conduce a la activación de NF-kappa-B. Se expresa IL-18R1 en pulmón, leucocitos, bazo, hígado, timo, próstata, intestino delgado, colon, placenta y corazón, y se encuentra ausente en cerebro, músculo esquelético, páncreas y riñón. Se observa un nivel alto de expresión en líneas celulares de enfermedad de Hodgkin. Se menciona el IL-18R1 en Parnet P. *et al.*, J. Biol. Chem. 271:3967-3970, 1996; Torigoe K. *et al.*, J. Biol. Chem. 272:25737-25742, 1997).

35

40

Se menciona la IL-18R1 y el anticuerpo contra IL-18R1 en los documentos n° US 7704945, n° US 7615220, n° US 7169581, n° US 7141393, n° US 6600022, n° EP 1047781, n° WO 2010/011697, n° WO 2009/015284, n° WO 2009/015284, n° WO 2009/074634, n° WO 2009/015284, n° WO 2007/117577, n° WO 2008/027236, n° WO 2007/117577, n° WO 2007/096398, n° WO 2005/097998A3, n° WO 2006/009114, n° WO 2005/097998, n° WO 2005/012352, n° WO 2003/080104, n° WO 2003/057821, n° WO 2003/008452A3, n° WO 2003/012061, n° WO 2001/085201, n° WO 2002/008272, n° WO1999/037772 y en Nishida Y. *et al.*, Hybridoma 17(6):577-580, 1998.

45

El objetivo de la invención es proporcionar anticuerpos contra IL-18R1 que resultan útiles como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como enfermedades mediadas por TH1, especialmente EPOC, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, lupus y enfermedades soriatías.

50 Descripción resumida de la invención

En la presente memoria se da a conocer un anticuerpo aislado ligante de IL-18R1 humano y que se caracteriza porque se une al mismo epítipo de IL-18R1 humano al que se une el anticuerpo monoclonal 1G12, que comprende como secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, SEC ID n° 1, y como secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, SEC ID n° 5, en el que dicho anticuerpo se une al IL-18R1 humano con una afinidad de unión de 10<sup>-8</sup> M o inferior.

55

60

La invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une a IL-18R1 humano y que se caracteriza porque comprende como CDR de región variable de cadena pesada una región CDRH1 de secuencia SEC ID n° 2 ó SEC ID n° 10, una región CDRH2 de secuencia SEC ID n° 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID n° 4, y como CDR de región variable de cadena ligera, una región CDRL1 de secuencia SEC ID n° 6, una región CDRL2 de secuencia SEC ID n° 7, y una región CDRL3 de secuencia SEC ID n° 8. Por lo tanto, únicamente la región CDRH1 de los

anticuerpos 1G12 y 2D11 es diferente y las otras regiones de CDR son idénticas (ver III. Descripción del listado de secuencias).

5 Una realización de la invención es un anticuerpo aislado ligante de IL-18R1 humano y que se caracteriza porque comprende como CDR de región variable de cadena pesada una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 10, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4, y como CDR de región variable de cadena ligera, una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 6, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 7 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 8. En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada comprende como CDR:a) una región CDRH1 de secuencia  
10 SEC ID nº 2, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4, o b) una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 10, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4

15 En otra realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el dominio variable de cadena ligera comprende como CDR una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 6, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 7 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 8.

En otra realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera comprenden como CDR:

- 20 a) una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 2, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4, y una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 6, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 7 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 8 ó  
b) una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 10, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4, y una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 6, una región CDRL2 de  
25 secuencia SEC ID nº 7 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 8.

La invención se refiere a un anticuerpo ligante de IL-18R1 humano y que se caracteriza porque comprende como región variable de cadena pesada, la secuencia SEC ID nº 1, y como región variable de cadena ligera la secuencia SEC ID nº 5 ó porque comprende como región variable de cadena pesada la secuencia SEC ID nº 9 y como región  
30 variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID nº 11,

La invención se refiere además a versiones humanizadas diferentes de los anticuerpos anteriormente indicados según la invención. Por lo tanto, la invención se refiere además a un anticuerpo humanizado caracterizado porque comprende:

- 35 a) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 30, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 31 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 32 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 34, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 35 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 36  
b) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 38, una región  
40 CDRH2 de secuencia SEC ID nº 39 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 40 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 42, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 43 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 44  
c) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 46, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 47 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 48 y como región variable de  
45 cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 50, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 51 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 52  
d) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 54, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 55 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 56 y como región variable de  
50 cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 58, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 59 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 60, o  
e) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH de secuencia SEC ID nº 62, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 63 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 64 y como región variable de  
55 cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 66, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 67 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 68.

En una realización, el anticuerpo humanizado según la invención se caracteriza porque comprende:

- a) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 29, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 33,  
60 b) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 37, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 41,  
c) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 45, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 49,

- d) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 53, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 57, o  
 e) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 61, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 65.

5 Una realización de la invención es un anticuerpo anti-IL-18R1 aislado en el que el anticuerpo comprende secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas de entre:

- (a) una secuencia de CDR-L1 que comprende los aminoácidos XASKSVSTSGDSYMH (SEC ID nº 69), en la que X es R o Q,  
 10 (b) una secuencia de CDR-L2 que comprende los aminoácidos LASNLES (SEC ID nº 7),  
 (c) una secuencia de CDR-L3 que comprende los aminoácidos QQSRELPLS (SEC ID nº 8),  
 (d) una secuencia de CDR-H1 que comprende los aminoácidos XYTFT (SEC ID nº 70), en la que X es D o G,  
 (e) una secuencia de CDR-H2 que comprende los aminoácidos TIDPSDSYTYX1QKX2X3G (SEC ID nº 71), en la que X1 es N o A, X2 es F o A, y X3 es K o Q, y  
 15 (f) una secuencia de CDR-H3 que comprende los aminoácidos SGDYDADRYFDV (SEC ID nº 4). Se dan a conocer además en la presente memoria versiones humanizadas de los anticuerpos anteriormente indicados.

20 Se da a conocer en la presente memoria un anticuerpo ligante de IL-18R1 humano y que se caracteriza porque se une al mismo epítipo de IL-18R1 al que se une el anticuerpo monoclonal 1G12. Por lo tanto, el anticuerpo se une al dominio 2 de IL-18R1. Un anticuerpo ejemplar es el anticuerpo 2D11 según la invención.

25 El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo monoclonal y, además, un anticuerpo quimérico que comprende una cadena constante humana o un anticuerpo humanizado. Resulta especialmente preferente es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo según la invención preferentemente comprende una parte Fc de origen humano. Los dominios variables de cadena ligera del anticuerpo según la invención preferentemente son de isotipo lambda humano. Una realización preferente de la invención es una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 1G12 o del anticuerpo 2D11. Preferentemente, el anticuerpo según la invención se caracteriza por las secuencias de aminoácidos o fragmentos y propiedades de secuencias de aminoácidos anteriormente indicados.

30 Preferentemente, el anticuerpo según la invención es de isotipo IgG1 o IgG4 humano. El anticuerpo según la invención preferentemente es de isotipo IgG1 modificado en la región bisagra en aproximadamente las posiciones aminoácidas 216 a 240, preferentemente en aproximadamente las posiciones 220 a 240, entre CH1 y CH2 y/o en la segunda región interdominio en aproximadamente las posiciones aminoácidos 327 a 331 entre CH2 y CH3. Preferentemente, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque es del isotipo IgG1 humano,  
 35 preferentemente comprendiendo la mutación L234A, que es alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234, y la mutación L235A, que es alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 235. Las posiciones aminoácidas pueden variar para diferentes alotipos en aproximadamente una o dos posiciones, de manera que la leucina en la posición aminoácida 234 podría encontrarse localizada en, por ejemplo, la posición 235 en dicho alotipo. Por lo tanto, la expresión "leucina en la posición aminoácida 234" se refiere a leucina situada en la posición  
 40 aminoácida 234 ó en una o dos posiciones anteriores o posteriores.

El anticuerpo según la invención preferentemente es del isotipo IgG4 humano con o sin la mutación S228P.

45 El anticuerpo preferentemente se caracteriza además por una afinidad de  $10^{-8}$  M ( $K_D$ ) o inferior, preferentemente de entre aproximadamente  $10^{-8}$  y  $10^{-13}$  M, preferentemente de entre aproximadamente  $10^{-9}$  y  $10^{-13}$  M en la unión al IL-18R1 humano. Preferentemente, un anticuerpo según la invención se une (reacciona cruzadamente) también a IL-18R1 de mono Cynomolgus.

50 La invención proporciona además métodos para la producción recombinante de dichos anticuerpos. La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo recombinante según la invención, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico codificante de un anticuerpo ligante de IL-18R1 en una célula huésped CHO y la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dichas células. La invención proporciona además un ácido nucleico codificante de un anticuerpo según la invención.

55 En la presente memoria se da a conocer además la utilización de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas. La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades,  
 60 preferentemente de enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, lupus, soriasis o enfermedades óseas. La invención comprende además un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades, preferentemente de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas, caracterizado porque

comprende un anticuerpo según la invención. Los anticuerpos según la invención se caracterizan por las propiedades anteriormente indicadas.

5 Se da a conocer además en la presente memoria métodos para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas, que comprende administrar en un paciente en el que se ha diagnosticado una de dichas enfermedades (y por lo tanto que necesita dicha terapia), un anticuerpo contra IL-18R1 según la invención. El anticuerpo puede administrarse solo, en una composición farmacéutica o alternativamente en combinación con otros medicamentos para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas. El anticuerpo se administra en una cantidad farmacéuticamente efectiva.

15 La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas y para la preparación de una composición farmacéutica según la invención. Además, la invención comprende un método para la preparación de una composición farmacéutica según la invención.

20 La invención comprende además un anticuerpo según la invención para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas.

25 La invención comprende además una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención, opcionalmente con un tampón y/o un adyuvante útiles para la formulación de anticuerpos con fines farmacéuticos.

30 La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo manufacturado o kit. La invención proporciona además la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer o de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas. El anticuerpo se utiliza en una cantidad farmacéuticamente efectiva.

35 La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas. El anticuerpo se utiliza en una cantidad farmacéuticamente efectiva.

40 Los anticuerpos según la invención presentan propiedades nuevas e inventivas que causan un beneficio para un paciente que sufre una enfermedad asociada a la señalización mediada por el receptor IL-18 y a la activación de la ruta de NFkappaB.

45 Los anticuerpos según la invención presentan propiedades nuevas e inventivas y se unen a IL-18R1 e inhiben la unión de IL-18 a IL-18R1. En consecuencia, se inhibe la formación del complejo entre IL-18R1 e IL-18RAP y la señalización por el complejo de receptor de IL-18. Lo anterior inhibe la activación de la ruta de NFkappaB.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: FACS contra células HEK293 transfectadas con IL-18R $\alpha$ /IL-18R $\beta$  humano.

Figura 2: FACS contra células HEK293 transfectadas con IL-18R $\alpha$ /IL-18R $\beta$  de mono Cynomolgus.

#### Descripción detallada de realizaciones de la invención

##### I. Definiciones

55 Un "marco humano aceptor" para los fines de la presente memoria es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, tal como se ha definido anteriormente. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 ó inferior, de 9 ó inferior, de 8 ó inferior, de 7 ó inferior, de 6 ó inferior, de 5 ó inferior, de 4 ó inferior, de 3 ó inferior o de 2 ó inferior. En algunas realizaciones, el marco humano del aceptor de VL presenta una secuencia idéntica a la secuencia de marco de la VL de inmunoglobulina humana o a la secuencia de marco de consenso humana.

5 El término “afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su pareja Y puede representarse de manera general con la constante de disociación ( $K_d$ ). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos de la técnica, incluyendo los indicados en la presente memoria. A continuación se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para la medición de la afinidad de unión.

10 Las expresiones “anticuerpo anti-IL-18R1” y “un anticuerpo que se une a IL-18R1” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a IL-18R1 humano con suficiente afinidad suficiente para que el anticuerpo resulte útil como agente diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de IL-18R1. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-IL-18R1 a una proteína no IL-18R1 no relacionada es inferior a aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a IL-18R1 según medición mediante resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a IL-18R1 presenta una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $10^{-8}$  M o inferior, por ejemplo de entre  $10^{-8}$  M y  $10^{-13}$  M, por ejemplo de entre  $10^{-9}$  M y  $10^{-13}$  M.

15 El término “anticuerpo” en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

20 Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

25 El término “cáncer” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer pulmonar de células bronquiolo-alveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de tiñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependinomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewings, incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o de una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados.

30 El término “quimérico” referido a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

35 La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones PVA236 (PVA236 se refiere a que la secuencia de aminoácidos ELLG (proporcionada en el código de aminoácidos de una letra) entre las posiciones aminoácidas 233 a 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 es sustituida por PVA), L234A/L235A y/o GLPSS331 (GLPSS331 se refiere a que en la región 331 ALPAP de IgG1 o GLPAP de IgG2 se modifica por GLPSS) o de la subclase IgG4. En una realización preferente adicional de la invención, el anticuerpo se caracteriza por ser de cualquier clase de Ig, siendo preferentemente IgG1 ó IgG4, conteniendo por lo menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración según el índice EU). Resultan especialmente preferentes las mutaciones de IgG1 PVA236, L234A/L235A y/o GLPSS331, así como la mutación de IgG4 denominada L235E. Resulta adicionalmente preferente que el anticuerpo de la subclase IgG4 contenga la mutación S228P o las mutaciones S228P y L235E (Angal S. *et al.*, Mol. Immunol. 30:105-108, 1993). Por lo tanto, el anticuerpo según la invención preferentemente es

un anticuerpo de la subclase IgG1 humana, que contiene una o más mutaciones de PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A (numeración según el índice EU).

El término "enfermedad" se refiere a una enfermedad mediada por IL18R1. Entre estas enfermedades mediadas por IL18R1 se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis sorbiática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus insulino-dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, soriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto contra el huésped, rechazo del trasplante de órgano, enfermedad inmunológica aguda o crónica asociada al trasplante de órgano, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome del choque tóxico, síndrome de la sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, neoplasias, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular esporádica de tipo I y deficiencia poliglandular de tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome del estrés respiratorio adulto, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía sorbiática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada a clamidia, *Yersinia* y *Salmonella*, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa, arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica Coombs-positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miélica/enfermedad del Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria criptogénica, síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis C, inmunodeficiencia común variable, hipogammaglobulinemia común, cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad del tejido conectivo asociada a enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad mixta del tejido conectivo asociada a enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada a enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada a enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso sistémico asociado a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad de Sjögren's, enfermedad pulmonar asociada a espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada a hem siderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida farmacológicamente, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial post-infecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria de tipo 1, hepatitis autoinmunitaria o lupoide clásica, hepatitis autoinmunitaria de tipo 2, hepatitis de anticuerpos anti-LKM, hipoglucemia mediada autoinmunitariamente, resistencia a la insulina de tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunológica aguda asociada al trasplante de órgano, enfermedad inmunológica crónica asociada al trasplante de órgano, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, soriasis de tipo 1, soriasis de tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmunitaria, NOS de enfermedad renal, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, todos los subtipos de la esclerosis múltiple, oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de la poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmunitaria gotosa o enfermedad de Hashimoto, hipotiroidismo autoinmunitaria atrófica, mixoedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitíligo, enfermedades hepáticas agudas, enfermedades hepáticas crónicas, alergia y asma, trastornos mentales, depresión, esquizofrenia y enfermedades mediadas por Th2 y mediadas por Th1.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo que varían con el isotipo del anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión de receptor de Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo receptores de células B) y activación de las células B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo de una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad que resulta eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

La expresión "mismo epítipo" se refiere a un anticuerpo según la invención, caracterizado por la inhibición de la unión del anticuerpo 1G12 a IL-18R1. Un anticuerpo resulta inhibido en su unión a IL-18R1 en el caso de que el anticuerpo se una al mismo epítipo de IL-18R1 que el anticuerpo 1G12 o en el caso de que resulte inhibido en su

unión a IL-18R debido a impedimentos estéricos de unión por parte de dicho anticuerpo de referencia. La inhibición de la unión entre IL-18R1 y un anticuerpo que debe investigarse puede detectarse mediante ensayo RPS (BIACORE). El anticuerpo anti-IL-18R1 que debe investigarse es capturado por un anticuerpo antiespecie acoplado a la superficie del chip a una concentración de 6 µg/ml (corresponde a 40 nM). A continuación, se inyectan 2,5 µg/ml de proteína IL-18R1 (corresponde a fusión de IL-18R1-Fc 20 nM) a una concentración de 20 nM en la superficie recubierta con anticuerpo. Para el análisis, se añade anticuerpo 1G12 a una concentración de 50 nM sobre dicha superficie durante 2 minutos y se mide la unión. Tras la inyección, cualquier reducción de señal o ningún cambio de la señal indica que el anticuerpo a investigación inhibe la unión de 1G12 a IL-18R1. En el caso de que además se encuentre el mismo resultado para el mismo ensayo, en el que, sin embargo, se haya inmovilizado el anticuerpo 1G12 y se haya añadido el anticuerpo bajo investigación, se dice que el anticuerpo bajo investigación se ha unido al "mismo epítipo". En contraste, un incremento de por lo menos 10% de la señal derivada por la inyección de anticuerpo en por lo menos uno de ambos ensayos, demuestra que el anticuerpo a investigación no inhibe la unión de 1G12 a IL-18R1.

Se ha encontrado además, que un anticuerpo que se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 1G12, también se une a un IL-18R1 mutado, en el que la mutación consiste de la mutación D1 SRIAL (SEC ID nº 19) a PRVTF (SEC ID nº 20), la mutación D1 de MKNYTQK (SEC ID nº 21) a VGNDRRN (SEC ID nº 22), la mutación D2 QTLVNSTS (SEC ID nº 23) a EELIQDTW (SEC ID nº 24), la mutación D2 NPTIKKN (SEC ID nº 25) a TPRILKD (SEC ID nº 26), o la mutación D2 de HFLHHNGKLF (SEC ID nº 27) a FSVHHNGTRY (SEC ID nº 28). Se ha encontrado además que un anticuerpo que se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 1G12, no se une a un IL-18R1 mutado, en el que se delecionan los dominios D1 y D2. Según lo mencionado anteriormente, una desviación de la señal para la unión de RPS a un IL-18R1 mutado tal como se ha indicado anteriormente que no excede 20% de la señal derivada mediante la unión de IL-18R1 no mutado demuestra que el anticuerpo que debe investigarse se une también a una variante de IL-18R1 mutada tal como se ha indicado anteriormente.

Una "parte o región Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por el experto en la materia y que se define basándose en el corte con papaína de los anticuerpos. La expresión define una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una parte de la región constante. La expresión incluye las regiones de Fc de secuencia nativa y las regiones de Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede encontrarse presente o no. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o en la región constante se lleva a cabo según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Preferentemente, la parte Fc es una parte Fc humana y resulta especialmente preferente de la subclase IgG4 humana, preferentemente mutada en la región bisagra (por ejemplo S228P y/o L235E) o una parte Fc mutada de la subclase IgG1 humana. Resultan más preferentes las partes Fc que comprenden las regiones constantes de cadena pesada seleccionadas de entre las regiones mostradas en SEC ID nº 14, 15, 16, 17 y 18. Las regiones constantes de cadena ligera preferentes se muestran en las secuencias SEC ID nº 12 y 13.

El término "marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable (RHV). La FR de un dominio variable generalmente consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. De acuerdo con lo anterior, las secuencias de CDR y de FR generalmente aparecen en la secuencia siguiente en VH (o en VL): FR1-CDR1(L1)-FR2-CDR2(L2)-FR3-CDR3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a un anticuerpo que presenta una estructura sustancialmente similar a la estructura nativa de un anticuerpo o que presenta cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se ha definido en la presente memoria.

Las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan intercambiamente y se refieren a células en las que se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de dichas células. Entre las células huésped se incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma con independencia del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en su contenido de ácidos nucleicos a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado o selección de entre las células originalmente transformadas se encuentra incluida en la presente memoria.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos aminoácidos más comunes en una selección de secuencias de marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo tal como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of



Immunological Interest, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD, 1991, vols. 1 a 3. En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa 1 tal como en Kabat *et al.*, *supra*. En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III tal como en Kabat *et al.*, *supra*.

5 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende los residuos aminoácidos de CDR no humanas y los residuos aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las CDR corresponden a las de un anticuerpo no humano, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado  
10 opcionalmente puede comprender por lo menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" o "versión humanizada" o "anticuerpo humanizado" de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización. En una realización, entre una y la totalidad de las seis CDR de un anticuerpo derivado de una especie no humana (por ejemplo el hámster) se injertan en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985. En una realización, una "versión humanizada de un anticuerpo" según la invención (que es de origen no humano) se refiere a un anticuerpo, que se basa en las secuencias de anticuerpo no humanas en las que VH y VL se humanizan mediante técnicas estándares (incluyendo la injertación de CDR) y opcionalmente la mutagénesis posterior de determinados aminoácidos en la región marco y la CDR. En una realización, pueden modificarse uno a cinco aminoácidos (por ejemplo hasta tres) en la región marco y/o uno a tres aminoácidos (por ejemplo hasta dos) en las CDR pueden modificarse con mutaciones adicionales. Por ejemplo, la mutagénesis puede basarse en el modelado molecular, tal como describen Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989, u otros. Las posiciones adecuadas para dichas mutaciones pueden identificarse, por ejemplo, mediante análisis de secuenciación o de homologías, mediante la selección del marco humano (enfoque de marcos fijos, identificación de homologías o de ajuste óptimo) mediante la utilización de secuencias de consenso, mediante la selección de FR de varias líneas germinales diferentes o mediante la sustitución de residuos no humanos en la superficie tridimensional por los residuos más comunes de los anticuerpos humanos o basándose en interacciones estéricas optimizadas. En una realización, dicha versión humanizada se quimeriza con una región constante humana.

30 La expresión "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que presentan una secuencia hipervariable y/o que forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; Chothia C. y Lesk A.M., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Con la excepción de la CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis CDR, tres en la VH (H1, H2 y H3) y tres en la VL (L1, L2 y L3). Las RHV generalmente comprenden residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), presentando éstas últimas una variabilidad de secuencia más alta y/o participando en el reconocimiento de antígeno. Las CDR ejemplares se encuentran en los residuos aminoácidos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2), 91 a 96 (L3), 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) y 96 a 102 (H3) (Chothia C. y Lesk A.M., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987) o en los residuos aminoácidos 24 a 34 de L1, 50 a 56 de L2, 89 a 97 de L3, 31 a 35B e H1, 50 a 65 de H2 y 95 a 102 de H3 (Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, publicación del NIH nº 91-3242). Con la excepción de la RDC1 en VH, las RDC generalmente comprenden los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las SDR se encuentran contenidas dentro de las regiones de las CDR denominadas CDR abreviadas, o CDR-a. Las CDR-a ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se encuentran en los residuos aminoácidos 31 a 34 de L1, 50 a 55 de L2, 89 a 96 de L3, 31 a 35B de H1, 50 a 58 de H2 y 95 a 102 de H3 (ver Almagro J.C. y Fransson J., Front Biosci. 13:1619-1633, 2008). A menos que se indique lo contrario, los residuos de CDR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo los residuos de FR) se numeran en la presente memoria según Kabat *et al.*, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas.

55 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, animales domesticados (por ejemplo vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

60 Un anticuerpo "aislado" es un anticuerpo que ha sido separado de un componente de su medio natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta una pureza superior a 95% ó 99% según se determina mediante, por ejemplo, métodos cromatográficos (por ejemplo HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de

los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos ver, por ejemplo, Flatman S. *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87, 2007.

- 5 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su medio natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenido en células que habitualmente contienen la molécula de ácido nucleico, aunque la molécula de ácido nucleico se encuentra presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.
- 10 La expresión "ácido nucleico aislado codificante de un anticuerpo anti-IL-18R1" se refiere a una o más moléculas de ácidos nucleicos codificantes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de los mismos), incluyendo una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos en un único vector o en vectores separados, y una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más localizaciones en una célula huésped.
- 15 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo que contienen mutaciones naturales o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, encontrándose presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. En
- 20 contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), estando dirigido cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales contra un único determinante de un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante
- 25 cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben utilizarse según la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el método del hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de expresión fágica y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, estando descritos en la presente memoria dichos métodos y otros métodos ejemplares para la preparación de anticuerpos
- 30 monoclonales.
- Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no se encuentra conjugado con una fracción heteróloga. El anticuerpo desnudo puede encontrarse presente en una formulación farmacéutica.
- 35 Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro. De extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena pesada presenta una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido de tres
- 40 dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena ligera presenta una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede ser de dos tipos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.
- 45 La expresión "impresos dentro del paquete" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.
- 50 La expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. La alineación con fines de determinación del
- 55 porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo utilizando software informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos generados
- 60 utilizando el programa informático de comparación de secuencias llamado ALIGN-2. El autor del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con la documentación para usuario en el U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en donde se encuentra registrado

con el nº TXU510087 del U.S. Copyright Office. El programa ALIGN-2 se encuentra disponible públicamente de Genentech Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para la utilización en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En la situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que presenta o que comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del modo siguiente:

### 100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos aminoácidos puntuados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de este programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se aprecia que, en el caso de que la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A frente a B no es igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B frente a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente memoria se obtienen tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma resulte efectiva, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que no resulta tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitación, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

El término "IL-18R1", tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la IL-18R1 humana (receptor 1 de la interleuquina-18, IL-18R $\alpha$ , miembro A de la familia similar al antígeno CD218, CD218a, Q13478 de UniProtKB/Swiss-Prot).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refieren a la intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la reducción de la velocidad de avance de la enfermedad y la mejora o el alivio del estado de la enfermedad. En algunas realizaciones, se utilizan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer el avance de la misma.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente presentan estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (RHV) (ver, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, sexta ed., W.H. Freeman and Co., página 91, 2007). Puede resultar suficiente un único dominio VH o VL para proporcionar especificidad de unión de antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno con el fin de cribar una biblioteca para dominios VL o VH complementarios, respectivamente (ver, por ejemplo, Portolano S. *et al.*, J. Immunol. 150:880-887, 1993; Clarkson T. *et al.*, Nature 352:624-628, 1991).

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de propagar otro ácido nucleico al que se encuentra unido. El término incluye el vector en forma de estructura de ácidos nucleicos autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que ha sido introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se encuentran ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión".

## II. Composiciones y métodos

En un aspecto, la invención se basa en anticuerpos que se unen a IL-18R1. Los anticuerpos de la invención resultan útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las

enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, la artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas, u otras enfermedades mediadas por IL18R1.

#### A. Anticuerpos anti-IL-18R1 ejemplares

5 En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-IL-18R1 según cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico o humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-IL-18R1 humano es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')<sub>2</sub>. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo un anticuerpo IgG1  
10 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo tal como se define en la presente memoria.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-IL-18R1 según cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, tal como se describe en las secciones posteriores:

15 En una realización, el anticuerpo humanizado según la invención se caracteriza porque comprende como CDR de región variable de cadena pesada una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 2 ó a la secuencia SEC ID nº 10, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 6, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 7 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 8.

En una realización, el anticuerpo humanizado según la invención se caracteriza porque comprende como región variable de cadena pesada, la secuencia SEC ID nº 1, y como región variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID nº 5, o como región variable de cadena pesada, la secuencia SEC ID nº 9, y como región variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID nº 11.

En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque comprende:

30 a) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 30, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 31 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 32 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 34, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 35 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 36

35 b) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 38, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 39 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 40 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 42, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 43 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 44

40 c) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 46, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 47 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 48 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 50, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 51 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 52

45 d) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 54, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 55 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 56 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 58, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 59 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 60, o

50 e) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 62, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 63 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 64 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 66, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 67 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 68.

En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque comprende:

55 a) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 29, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 33,

b) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 37, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 41,

60 c) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 45, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 49,

d) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 53, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 57, o

e) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 61, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 65.

### 1. Afinidad de anticuerpos

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria presenta una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  M o inferior, por ejemplo de entre  $10^{-8}$  M y  $10^{-13}$  M, por ejemplo de entre  $10^{-9}$  M y  $10^{-13}$  M.

10 Se midió  $K_D$  utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIACORE®-T100 o un BIACORE®-A100 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) a 25°C con chips CM5 con antígeno inmovilizado al nivel de 10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se diluyó el antígeno o un anticuerpo de captura adecuado con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto, alcanzando aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del proteína, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Antes del suceso de unión que debe medirse, una pareja de unión ya se encuentra inmovilizada en la superficie o ha sido captura con un sistema de captura adecuado (por ejemplo anticuerpos específicos de IgG humana para capturas las IgGs humanas). Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab/anticuerpo/antígeno (0,78 nM a 500 nM) en surfactante de PBS con polisorbato 20 al 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 30 µl/minuto. Tras el suceso de unión, se regenera la superficie para el ciclo siguiente. Las tasas de asociación ( $k_a$ ) y de disociación ( $k_d$ ) se calcularon utilizando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (software de evaluación BIACORE® T100, versión 4.1) mediante ajuste simultáneo de las curvas de asociación y de disociación. La constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) se calculó como la proporción  $k_d/k_a$ . Ver, por ejemplo, Chen Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999. En el caso de  $k_a$  exceda  $10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> según el ensayo de resonancia de plasmón superficial indicado anteriormente, la tasa on puede determinarse mediante la utilización de una técnica de inhibición de fluorescencia que mida el incremento o reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación a 295 nm, emisión a 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro dotado de un sistema de interrupción de flujo.

### 2. Fragmentos de anticuerpo

35 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un fragmento de anticuerpo. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos indicados posteriormente. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, ver Hudson P.J. *et al.*, Nat. Med. 9:129-134, 2003. Para una revisión de los fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plueckthun, en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), RPSinger-Verlag, New York (1994), páginas 269 a 315; ver también la patente WO nº 93/16185, y las patentes US nº 5.571.894 y nº 5.587.458. Para un comentario de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítipo ligante de receptor de reciclaje y que presenta una vida media incrementada, ver la patente US nº 5.869.046.

45 Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, las patentes EP nº 404.097 y WO nº 1993/01161; Hudson P.J. *et al.*, Nat. Med. 9:129-134, 2003, y Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se encuentran descritos en Hudson P.J. *et al.*, Nat. Med. 9:129-134, 2003.

50 Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de único dominio es un anticuerpo de único dominio humano (Domantis Inc., Waltham M.A.; ver, por ejemplo, la patente US nº 6.248.516 B1).

55 Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por parte de células huésped recombinantes (por ejemplo *E. coli* o fagos), tal como se describe en la presente memoria.

### 3. Anticuerpos multiespecíficos

60 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que presentan especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para IL-18R1 y la otra es para cualquier otro antígeno. En

determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de IL-18R1. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos en forma de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

5 Entre las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos se incluyen, aunque sin limitación, la coexpresión recombinante de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que presentan especificidades diferentes (ver Milstein C. y Cuello A.C., *Nature* 305:537-540, 1983, el documento n° WO 93/08829, y Traunecker A. *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659, 1991) y las construcciones de “botón-en-oyal” (ver, por ejemplo, la patente US n° 5.731.168). También pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos mediante la manipulación de efectos de  
10 orientación electrostática para la preparación de moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento n° WO 2009/089004), el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente US n° 4.676.980, y Brennan M. *et al.*, *Science* 229:81-83, 1985), la utilización de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553, 1992), la utilización de la tecnología de “diacuerpos” para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos (ver, por ejemplo, Holliger P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993) y la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv) (ver, por ejemplo, Gruber M. *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368-5374, 1994) y la preparación de anticuerpos trispecíficos tal como se describe en, por ejemplo, Tutt A. *et al.*, *J. Immunol.* 147:60-69, 1991.

20 Los anticuerpos manipulados con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales, incluyendo los “anticuerpos Octopus” también se encuentran incluidos en la presente memoria (ver, por ejemplo, el documento n° US 2006/0025576A1).

25 El anticuerpo o fragmento en la presente memoria también incluye un “Fab de doble acción” o “DAF”, que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a IL-18R1, así como a otro antígeno diferente (ver el documento n° US 2008/0069820, por ejemplo).

#### 4. Variantes de anticuerpo

##### 30 a) Variantes de glucosilación

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria se altera para incrementar o reducir el grado con el que se glucosila el anticuerpo. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede llevarse a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que se genere o se elimine uno o más sitios de glucosilación.

35 En el caso de que el anticuerpo comprenda una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente se une mediante un enlace de nitrógeno a Asn297 del dominio CH2 de la región de Fc (ver, por ejemplo, Wright A. *et al.*, *TIBTECH* 15:26-32, 1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura oligosacárida biantenarica. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en el anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

45 La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad media de fucosa dentro de la cadena sacárida en Asn297, respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), según medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en el documento n° WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden presentar una función ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente US n° 2003/0157108 (Presta L.), n° 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con las variantes de anticuerpo “desfucosiladas” o “deficientes en fucosa” se incluyen:  
55 las patentes US n° 2003/0157108, WO n° 2000/61739, WO n° 2001/29246, US n° 2003/0115614, US n° 2002/0164328, US n° 2004/0093621, US n° 2004/0132140, US n° 2004/0110704, US n° 2004/0110282, US n° 2004/0109865, WO n° 2003/085119, WO n° 2003/084570, WO n° 2005/035586, WO n° 2005/035778, WO n° 2005/053742, WO n° 2002/031140; Okazaki A. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki N. *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87:614-622, 2004. Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados se incluyen las células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de las proteínas (Ripka J. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 24:533-545, 1986; la solicitud de patente US n° 2003/0157108 A1, Presta L. y la patente WO n° 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11) y las líneas celulares con inactivación génica tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, las células CHO con inactivación génica (ver, por ejemplo,  
60

Yamane-Ohnuki N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87:614-622, 2004; Kanda Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94:680-688, 2006, y la patente WO n° 2003/085107).

Las variantes de anticuerpo se proporcionan además con oligosacáridos bisectados, por ejemplo en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se encuentra bisectado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden presentar un nivel reducido de fucosilación y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo en, por ejemplo, el documento n° WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*), la patente US n° 6.602.684 (Umana *et al.*) y el documento n° US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden presentar una función CDC mejorada. Se describen dichas variantes de anticuerpo en, por ejemplo, los documentos n° WO 1997/30087 (Patel *et al.*), n° WO 1998/58964 (Raju S.) y n° WO 1999/22764 (Raju S.).

#### b) Variantes de región Fc

En determinadas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria, generando de esta manera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones aminoácidas.

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que presenta algunas, aunque no todas, las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo *in vivo* resulta importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) resultan innecesarias o perjudiciales. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o de ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) que garanticen que el complejo no presenta unión a FcγR (por lo tanto que probablemente no presenta actividad de ADCC), aunque conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, únicamente expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch J.V. y Kinet J.P., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991. Se describen ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente US n° 5.500.362 (ver, por ejemplo, Hellstrom I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063, 1986) y Hellstrom I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502, 1985; patente US n° 5.821.337 (ver Brueggemann M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987). Alternativamente, pueden utilizarse métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA, y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96®, Promega, Madison, WI). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes R. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656, 1998. También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y que por lo tanto no presenta actividad de CDC. Ver, por ejemplo, la ELISA de la unión de C1q y de C3c en las patentes WO n° 2006/029879 y n° 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro H. *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163-171, 1996; Cragg M.S. *et al.*, Blood 101:1045-1052, 2003; y Cragg M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743, 2004). Las determinaciones de unión y eliminación/vida media *in vivo* también pueden llevarse a cabo utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. *et al.*, Intl. Immunol. 18:1759-1769, 2006).

Entre los anticuerpos con una función efectora reducida se incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc n° 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente US n° 6.737.056). Entre dichos Fc mutantes se incluyen los Fc mutantes con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoácidas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo la Fc mutante denominada "DANA", con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente US n° 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR (ver, por ejemplo, los documentos n° US 6.737.056 y n° WO 2004/056312, y Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunas realizaciones, pueden realizarse alteraciones en la región Fc que resultan en una unión de C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o reducida), por ejemplo tal como se describe en los documentos nº US 6.194.551, nº WO 99/51642, e Idusogie *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184, 2000.

5 Los anticuerpos con vidas medias incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), los cuales son responsable de la transferencia de las IgG maternas hasta el feto (Guyer R.L. *et al.*, J. Immunol. 117:587-593, 1976, y Kim J.K. *et al.*, J. Immunol. 24:2429-2434, 1994), se describen en el documento nº US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Entre dichas Fc variantes se incluyen aquéllas con sustituciones en uno o más de los  
10 residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, por ejemplo la sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente US nº 7.371.826).

Ver también Duncan A.R. y Winter G., Nature 332:738-740, 1988, y la patente US nº 5.648.260, la patente US nº 5.624.821 y el documento nº WO 94/29351 referentes a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

15 c) Variantes de anticuerpo con manipulación de las cisteínas

En determinadas realizaciones puede resultar deseable crear anticuerpos con manipulación de las cisteínas, por ejemplo los "tioMAB", en los que se sustituyen uno o más residuos de un anticuerpo por residuos de cisteína. En  
20 realizaciones particulares, los residuos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de aquellos residuos con cisteína, se sitúan los grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros grupos, tales como grupos farmacológicos o grupos de molécula conectora-fármaco, con el fin de crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. En determinadas realizaciones, puede sustituirse por cisteína uno o más cualesquiera de los  
25 residuos siguientes: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración EU) de la cadena pesada y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos con manipulación de cisteínas tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 7.521.541.

30 d) Derivados de anticuerpo

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria puede modificarse adicionalmente para que contenga grupos no proteicos adicionales que son conocidos de la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Entre los grupos adecuados para la derivatización del anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitativos de polímeros solubles en agua se  
35 incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas de preparación debido a su estabilidad en agua. El  
40 polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unido al anticuerpo puede variar, y en el caso de que se una más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones entre las que se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las propiedades o funciones  
45 particulares del anticuerpo que debe mejorarse, la opción de que el derivado de anticuerpo se utilice en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un grupo no proteico que puede calentarse selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, el grupo no proteico es un nanotubo de carbono (Kam N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, aunque sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan el grupo no proteico hasta una temperatura a las que las células próximas al anticuerpo-grupo no proteico resultan eliminadas.

55 B. Métodos y composiciones recombinantes

Pueden producirse anticuerpos utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado codificante de un anticuerpo anti-IL-18R1 descrito en la presente memoria. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de  
60 aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula



huésped comprende (por ejemplo ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo una célula Y0, NS0 ó Sp20). En una realización, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo anti-IL-18R1, en el que el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico codificante del anticuerpo, tal como se ha proporcionado anteriormente, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo a partir de las células huésped (o medio de cultivo de las células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-IL-18R1, se aísla un ácido nucleico codificante de un anticuerpo, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación adicional y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procarióticas o eucarióticas indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular en el caso de que la glucosilación y la función efectora de Fc no resulten necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.648.237, nº 5.789.199 y nº 5.840.523 (ver también Charlton K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (editor), Humana Press, Totowa, NJ, 2003, páginas 245 a 254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Tras la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación han sido "humanizadas", resultando en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross T.U., *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, 2004, y Li H. *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215, 2006.

También se derivan células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen las células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden utilizarse conjuntamente con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.959.177, nº 6.040.498, nº 6.420.548, nº 7.125.978 y nº 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También pueden utilizarse células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles líneas celulares de mamífero adaptadas para el crecimiento en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), la línea renal embrionaria humana (293 ó células 293 tal como se describe en, por ejemplo, Graham F.L. *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59-74, 1977), células renales de hámster neonato (BHK), células de sertoli de ratón (células TM4 tal como se describe en, por ejemplo, Mather J.P., *Biol. Reprod.* 23:243-252, 1980), las células renales de mono (CV1), las células renales de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humano (HELA), células renales caninas (MDCK), células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A), células pulmonares humanas (W138), células hepáticas humanas (Hep G2), tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI, tal como se describe en, por ejemplo, Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1982; células MRC 5 y células FS4. Entre otras líneas celulares huésped de mamífero útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980) y las líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, por ejemplo, Yazaki P.J. *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 248:255-268, 2003.

### C. Métodos y composiciones para el diagnóstico y detección

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-IL-18R1 proporcionados en la presente memoria resulta útil para la detección de la presencia de IL-18R1 en una muestra biológica. El término "detección" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido tumoral.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-IL-18R1 para la utilización en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de IL-18R1 en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-IL-18R1 tal como se describe en la presente memoria, bajo condiciones permisivas de la unión del anticuerpo anti-IL-18R1 a IL-18R1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-IL-18R1 e IL-18R1. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se utiliza un anticuerpo anti-IL-18R1 para seleccionar los sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo anti-IL-18R1, por ejemplo en el caso de que IL-18R1 sea un marcador biológico para la selección de pacientes.

Son trastornos ejemplares que pueden diagnosticarse utilizando un anticuerpo de la invención, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, la artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas.

En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-IL-18R1 marcados. Entre los marcajes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, marcajes o grupos que se detectan directamente (tales como marcajes fluorescentes, cromofóricos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como grupos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo mediante una reacción enzimática o una interacción molecular. Entre los marcajes ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los isótopos radioactivos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  e  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido, por ejemplo glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con un enzima que utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor-pigmento, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcajes de espín, marcajes de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

#### D. Formulaciones farmacéuticas

Se prepararon formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-IL-18R1 tal como se ha descrito en la presente memoria mediante la mezcla de dicho anticuerpo que presenta el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A. (editor), 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil-amónico, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenes tales como metilparabén o propilparabén; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Entre los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente memoria se incluyen además agentes de dispersión de fármaco intersticial, tales como glucoproteínas hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo las glucoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.). Determinados sHASEGP ejemplares y métodos de utilización, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente nº US 2005/0260186 y nº US 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones liofilizadas ejemplares de anticuerpos en la patente US nº 6.267.958. Entre las formulaciones acuosas de anticuerpos se incluyen los indicados en la patente US nº 6.171.586 y el documento nº WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación en la presente memoria también puede contener más de un ingrediente activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. Dichos ingredientes activos se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en

macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A. (editor), 1980.

5 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, encontrándose las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas.

10 Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede alcanzarse fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estéril.

#### 10 E. Métodos y composiciones terapéuticos

15 Puede utilizarse en métodos terapéuticos cualquiera de los anticuerpos anti-IL-18R1 proporcionados en la presente memoria.

20 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-IL-18R1 para la utilización como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-IL-18R1 para la utilización en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, la artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas, u otras enfermedades mediadas por IL18R1. En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo anti-IL-18R1 para la utilización en un método de tratamiento. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-18R1 para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, artritis reumatoide, lupus, soriasis o una enfermedad ósea, que comprende la administración en el individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-IL-18R1. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-18R1 para la utilización en el bloqueo de la interacción entre IL-18 y los receptores IL-18R1 e IL18RAP, nº de acceso Uniprot. 095256 y la inhibición de la señalización mediada por el receptor de IL-18 y la activación de la ruta de NFkappaB. La ruta de NFkappaB y su activación (señalización) se describe en, por ejemplo, Kearns J.D. y Hoffmann A., J. Biol. Chem. 284:5439-5443, 2009. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas preferentemente es un ser humano.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona la utilización de un anticuerpo anti-IL-18R1 en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento está destinado al tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las enfermedades inflamatorias, las enfermedades autoinmunitarias, la artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), las enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas, que comprende la administración en un individuo que presenta la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), las enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, la artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas de una cantidad efectiva del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. En una realización adicional, el medicamento resulta útil para bloquear la interacción entre IL-18 y los receptores IL-18R1 e IL18RAP, nº de acceso Uniprot 095256 y la inhibición de la señalización mediada por el receptor de IL-18 y la activación de la ruta de NFkappaB en un individuo. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las enfermedades inflamatorias, las enfermedades autoinmunitarias, la artritis reumatoide, el lupus, la soriasis o las enfermedades óseas. En una realización, el método comprende la administración en un individuo que presenta dicha enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria, autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedad ósea, de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-IL-18R1. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

60 Preferentemente, el anticuerpo según la invención bloquea la interacción entre IL-18 y los receptores IL-18R1 e IL-18RAP, nº de acceso Uniprot 095256 e inhibe la señalización mediada por el receptor de IL-18 y la activación de la ruta de NFkappaB. Dicho anticuerpo es el anticuerpo 1G12 o el anticuerpo 2D11. En una realización, el método comprende la administración en el individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-IL-18R1. En una realización, un "individuo" es un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-IL-18R1 proporcionados en la presente memoria, por ejemplo para la utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente indicados. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-IL-18R1 proporcionados en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-IL-18R1 proporcionados en la presente memoria y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se indica posteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, puede coadministrarse un anticuerpo de la invención con por lo menos un agente terapéutico adicional.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local y la administración intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede realizarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se encuentran contempladas dentro de la presente memoria diversos programas de dosificación, aunque sin limitación, las administraciones individuales o múltiples en diversos puntos del tiempo, la administración de bolo y la infusión de pulsos.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse, dosificarse y administrarse de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores a considerar en el presente contexto se incluyen el trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por el profesional médico. El anticuerpo opcionalmente, no necesariamente, se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente. Estos generalmente se utilizan en las mismas dosis y por vías de administración tales como las indicadas en la presente memoria, o entre aproximadamente 1% y 99% de las dosis indicadas en la presente memoria, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que resulta apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (utilizado solo o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, del tipo de anticuerpo, de la severidad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, una dosis candidata inicial puede ser de entre aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (por ejemplo de entre 0,1  $\text{mg}/\text{kg}$  y 10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) para la administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 100  $\text{mg}/\text{kg}$  o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,05  $\text{mg}/\text{kg}$  y aproximadamente 10  $\text{mg}/\text{kg}$ . De esta manera, puede administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5  $\text{mg}/\text{kg}$ , 2,0  $\text{mg}/\text{kg}$ , 4,0  $\text{mg}/\text{kg}$  ó 10  $\text{mg}/\text{kg}$  (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis inferiores. Un régimen ejemplar de dosificación comprende la administración de entre aproximadamente 4 y 10  $\text{mg}/\text{kg}$ . Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriormente indicados puede llevarse a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a un anticuerpo anti-IL-18R1.

## F. Artículos fabricados

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo fabricado que contiene materiales que resultan útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos indicados anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o impreso en el paquete o asociado al recipiente. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta, por sí misma o en combinación con otra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y que puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o impreso en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente terapéutico adicional. El artículo fabricado en la presente realización de la invención puede comprender además un impreso en el paquete que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (ABPI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos fabricados anteriormente indicados puede incluir un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a un anticuerpo anti-IL-18R1.

## III. Descripción del listado de secuencias

	SEC ID nº 1	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 1G12
	SEC ID nº 2	CDRH1 de cadena pesada de mAb 1G12
30	SEC ID nº 3	CDRH2 de cadena pesada de mAb 1G12
	SEC ID nº 4	CDRH3 de cadena pesada de mAb 1G12
	SEC ID nº 5	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 1G12
	SEC ID nº 6	CDRL1 de cadena ligera de mAb 1G12
	SEC ID nº 7	CDRL2 de cadena ligera (variante 1), mAb 1G12
35	SEC ID nº 8	CDRL3 de cadena ligera, mAb 1G12
	SEC ID nº 9	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 2D11
	SEC ID nº 10	CDRH1 de cadena pesada de mAb 2D11
	SEC ID nº 11	CDRH2 de cadena pesada de mAb 2D11
	SEC ID nº 12	CDRH3 de cadena pesada de mAb 2D11
40	SEC ID nº 13	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 2D11
	SEC ID nº 14	CDRL1 de cadena ligera de mAb 2D11
	SEC ID nº 15	CDRL2 de cadena ligera de mAb 2D11
	SEC ID nº 16	CDRL3 de cadena ligera de mAb 2D11
	SEC ID nº 17	Cadena ligera kappa humana
45	SEC ID nº 18	Cadena ligera lambda humana
	SEC ID nº 19	IgG1 humana (alotipo caucásico)
	SEC ID nº 20	IgG1 humana (alotipo afroamericano)
	SEC ID nº 21	IgG1 humana mutante LALA (alotipo caucásico)
	SEC ID nº 22	IgG4 humana
50	SEC ID nº 23	IgG4 humana mutante SPLE
	SEC ID nº 24 a 28:	fragmentos y fragmentos mutantes de IL-18R $\alpha$
	SEC ID nº 29	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 1G12-9,6 humanizado
	SEC ID nº 30	CDRH1 de cadena pesada de mAb 1G12-9,6 humanizado
	SEC ID nº 31	CDRH2 de cadena pesada de mAb 1G12-9,6 humanizado
55	SEC ID nº 32	CDRH3 de cadena pesada de mAb 1G12-9,6 humanizado
	SEC ID nº 33	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 1G12-9,6 humanizado
	SEC ID nº 34	CDRL1 de cadena ligera de mAb 1G12-9,6 humanizado
	SEC ID nº 35	CDRL2 de cadena ligera de mAb 1G12-9,6 humanizado
	SEC ID nº 36	CDRL3 de cadena ligera de mAb 1G12-9,6 humanizado
60	SEC ID nº 37	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 1G12-10,5 humanizado
	SEC ID nº 38	CDRH1 de cadena pesada de mAb 1G12-10,5 humanizado
	SEC ID nº 39	CDRH2 de cadena pesada de mAb 1G12-10,5 humanizado
	SEC ID nº 40	CDRH3 de cadena pesada de mAb 1G12-10,5 humanizado

	SEC ID nº 41	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 1G12-10,5 humanizado
	SEC ID nº 42	CDRL1 de cadena ligera de mAb 1G12-10,5 humanizado
	SEC ID nº 43	CDRL2 de cadena ligera de mAb 1G12-10,5 humanizado
	SEC ID nº 44	CDRL3 de cadena ligera de mAb 1G12-10,5 humanizado
5	SEC ID nº 45	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 46	CDRH1 de cadena pesada de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 47	CDRH2 de cadena pesada de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 48	CDRH3 de cadena pesada de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 49	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 1G12-10,6 humanizado
10	SEC ID nº 50	CDRL1 de cadena ligera de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 51	CDRL2 de cadena ligera de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 52	CDRL3 de cadena ligera de mAb 1G12-10,6 humanizado
	SEC ID nº 53	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 1G12-11,6 humanizado
	SEC ID nº 54	CDRH1 de cadena pesada de mAb 1G12-11,6 humanizado
15	SEC ID nº 55	CDRH2 de cadena pesada de mAb 1G12-11,6 humanizado
	SEC ID nº 56	CDRH3 de cadena pesada de mAb 1G12-11,6 humanizado
	SEC ID nº 57	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 1G12-11,6 humanizado
	SEC ID nº 58	CDRL1 de cadena ligera de mAb 1G12-11,6 humanizado
	SEC ID nº 59	CDRL2 de cadena ligera de mAb 1G12-11,6 humanizado
20	SEC ID nº 60	CDRL3 de cadena ligera de mAb 1G12-11,6 humanizado
	SEC ID nº 61	región variable de cadena pesada (VH) de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 62	CDRH1 de cadena pesada de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 63	CDRH2 de cadena pesada de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 64	CDRH3 de cadena pesada de mAb 1G12-12,6 humanizado
25	SEC ID nº 65	región variable de cadena ligera (VL) de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 66	CDRL1 de cadena ligera de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 67	CDRL2 de cadena ligera de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 68	CDRL3 de cadena ligera de mAb 1G12-12,6 humanizado
	SEC ID nº 69	secuencia de consenso de CDRL1 de cadena ligera
30	SEC ID nº 70	secuencia de consenso de CDRH1 de cadena ligera
	SEC ID nº 71	secuencia de consenso de CDRH2 de cadena ligera
	SEC ID nº 72	IL-18R1 humana (IL-18R $\alpha$ )

## EJEMPLOS

35 A continuación se proporcionan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

40 Aunque la invención anteriormente proporcionada ha sido descrita en cierto detalle a título ilustrativo y ejemplar con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Las exposiciones de toda la literatura de patentes y científica citada en la presente memoria se incorporan expresamente en su totalidad como referencia.

### Ejemplo 1

45 Inmunización

50 Se utilizaron ratones NMRI de 8 a 10 semanas de edad para la inmunización. Se llevó a cabo la inmunización mediante vacunación de ADN. Brevemente, se inyectaron intradérmicamente 30  $\mu$ l en agua de plásmido de ADN que expresaba ambas cadenas (alfa y beta) del receptor de IL-18 humano en el lomo de ratones anestesiados con isoflurano inmediatamente antes de la electroporación. La inmunización se llevó a cabo cada 2 semanas sin ningún adyuvante. Los ratones se sangraron periódicamente para determinar si se había desarrollado una respuesta de anticuerpos correcta. Con este fin se extrajo sangre del seno retroorbital y se sometió a ensayo suero en un ELISA específico para IL-18R $\alpha$ , así como en un ensayo de KG-1/IFN $\gamma$  funcional y en un Biacore para la selección del animal apropiado para la fusión. Los ratones recibieron un refuerzo intravenoso de antígeno 4 días antes de la recolección de los bazos para activar las células B e incrementar el número de células positivas para antígeno situadas en el bazo. Se recolectaron bazos de ratones adecuadamente inmunizados inmediatamente antes de la fusión con células de mieloma.

### Ejemplo 2

60 Inhibición de la unión de IL-18<sub>hu</sub> a complejo de IL-18R $\alpha\beta$  (ELISA)

El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación de 384 pocillos a temperatura ambiente (TA). Tras cada etapa de incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBST (solución salina tamponada con fosfato Tween<sup>®</sup>-20). Al inicio, las placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de fragmento Fc de cabra anti-IgG humana (Jackson Imm. Res., US, n° de cat. 109-006-170) durante por lo menos 2 horas (h). A continuación, los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con Tween<sup>®</sup>-20 al 0,1% y BSA al 2% (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 hora. Se capturaron 0,2 µg/ml de quimera IL-18R $\alpha$ :Fc humana recombinante (R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 816-LR) durante 1 hora. Las diluciones de los anticuerpos purificados en PBS con BSA al 0,5% y Tween<sup>®</sup>-20 al 0,05% se incubaron con la proteína receptora durante 1 hora. Se añadieron IL-18 humana biotinilada (MBL International, US, n° de cat. B003-5) y 0,2 µg/ml de IL-18R $\beta$  (R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 118-AP) durante una hora adicional para construir el complejo trimérico. La IL-18 se biotiniló con sulfo-NHS-LC-biotina (Thermo Scientific Pierce, US, n° de cat. 21327) siguiendo el protocolo del fabricante y se purificó utilizando la columna desaladora de centrifugación Zeba<sup>™</sup> (Thermo Scientific Pierce, US, n° de cat. 89889). La unión de la IL-18 biotinilada al complejo se detectó con estreptavidina-HRP diluido a 1:2.000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, n° de cat. 11089153001). Tras 1 hora, las placas se lavaron 6 veces con PBST y se revelaron con solución de sustrato de POD BM blue<sup>®</sup> recién preparada (BM blue<sup>®</sup>: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Roche Diagnostics GmbH, DE, n° de cat. 11484281001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 370 nm. Se definió el control negativo con ausencia de proteína IL-18R $\alpha$  y el control positivo como la presencia de todos los componentes aunque sin anticuerpo. Para la comparación se utilizó el clon 70625 de mAb murino anti-IL-18R $\alpha$  humano (R&D Systems, n° MAB840). Se muestran los resultados en la Tabla 1:

Tabla 1:

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (nM)
F20.1G12	0,022	0,15
F20.2D11	0,029	0,19
Mab 840	0,044	0,29

IL-18R $\beta$ : proteína accesoria del receptor de la IL-18 humana, IL-18RAP (Uniprot n° de acceso 095256).

### Ejemplo 3

producción de IFN $\gamma$  inducida por IL-18 por parte de células KG-1 humanas

#### a) Reactivos:

línea celular KG1 (ATCC n° CCL246) Medio de cultivo: RPMI 1640 complementado con FCS al 10% con Pen/Strep  
 IL-18 humana recombinante (RnD Systems, n° B003-2)  
 juego ELISA de IFN $\gamma$  humana BD OptEIA (BD, n° 555142)  
 TNFalfa<sub>rh</sub> (R&D, n° de cat. 210-TA).

#### b) Procedimiento:

Se cultivaron células KG-1 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y Pen/Strep en una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire a 37°C. Se subcultivaron las células al alcanzar una densidad de 2x10<sup>5</sup> células/ml y se diluyeron hasta una densidad de 4x10<sup>5</sup> células/ml. Para determinar la concentración efectiva de IL-18, se resuspendieron las células KG-1 a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml y 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio de crecimiento con diversas dosis de IL-18<sub>rh</sub> (0 a 200 ng/ml); se recogieron los sobrenadantes para el análisis de ELISA de IFN $\gamma$ . Se preincubaron los anticuerpos con células KG-1 a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml y 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio de crecimiento durante 60 minutos (concentraciones finales de entre 1 ng/ml y 10 µg/ml), se añadieron IL-18<sub>rh</sub> (10 ng/ml) y TNF-alfa (5 ng/ml) al cultivo y se incubaron durante 16 a 20 horas a 37°C. Los sobrenadantes se recogieron para el análisis de ELISA de IFN $\gamma$ . Se estimularon las células KG-1 durante la noche con 10 ng/ml de TNFalfa para inducir la expresión de IL18R. A continuación se incubaron las células con anticuerpos anti-IL18R durante diferentes periodos de tiempo, seguido de: a) la detección del anticuerpo unido, o b) la determinación de la expresión superficial de IL18R. Se muestran los resultados en la Tabla 2. Por ejemplo, mAb 840 anti-IL-18Ra (R&D Systems), mostró un valor de IC<sub>50</sub> [pM] de 798.

Tabla 2:

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> [pM]
mAb 1G12	27
mAb 2D11	43

### Ejemplo 4

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-IL-18R $\alpha$  para el IL-18R $\alpha$ <sub>h</sub> de longitud completa (quimera de Fc<sub>h</sub>)

Instrumento: BIACORE® A100  
 Chip: CM3 (GE Healthcare BR-1006-36)  
 Acoplamiento: de aminas  
 5 Tampón: 1x PBS (10x PBS, Ambion nº de cat. AM9625), pH 7,4, 37°C

Para las mediciones de afinidad, se acoplaron 10 µg/ml de anticuerpos anti-Fcγ de ratón (de cabra, Jackson ImmunoResearch JIR115-005-071) ó 10 µg/ml de anticuerpos anti-Fcγ humana (de cabra, Jackson ImmunoResearch JIR109-005-098) a la superficie de un chip para la captura de los anticuerpos contra IL-18Rα<sub>h</sub>. Se añadió IL-18Rα<sub>h</sub> (quimera de Fc<sub>h</sub>, R&D Systems, nº 816-LR) a diversas concentraciones en una solución que contenía BSA al 0,1% (Roche, ref. nº 10238040001). Se midió la asociación mediante una inyección de ILR-18Rα<sub>h</sub> de 1,5 minutos a 37°C; se midió la disociación mediante lavado de la superficie del chip con tampón durante 10 minutos a 37°C. Para el cálculo de la K<sub>D</sub> aparente y otros parámetros cinéticos, se utilizó el modelo 1:1 de Langmuir. Se muestran los resultados en la Tabla 3.

15 Tabla 3: Datos de afinidad medidos mediante RPS (BIACORE® T100) a 37°C

Anticuerpo	K <sub>D</sub> aprox. (M)	K <sub>a</sub> (1/Ms)	K <sub>d</sub> (1/s)	t <sub>1/2</sub> (min.)
mAb 1G12	2,7x10 <sup>-11</sup>	8,2x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>-4</sup>	58
mAb 2D11	2,7x10 <sup>-11</sup>	7,0 x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>-4</sup>	62
MS	6,4x10 <sup>-11</sup>	5,1 x10 <sup>6</sup>	3,0x10 <sup>-4</sup>	39

MS: anticuerpo de secuencia SEC ID nº 3 y 4 del documento nº WO 2007/096396.

Ejemplo 5a

20 Competición cruzada mediante la utilización de RPS

Instrumento: BIACORE® A100  
 Chip: CM5 (Biacore BR-1006-68)  
 Acoplamiento: de aminas  
 25 Tampón: 1x PBS (10x PBS, Ambion nº de cat. AM9625), pH 7,4, 25°C

Para los ensayos de mapeado de epítomos mediante la competición cruzada, se acoplaron 30 µg/ml de anticuerpos anti-Fcγ de ratón o anticuerpos anti-Fcγ humanos (de cabra, Jackson ImmunoResearch, nº de cat. 115-005-071 y nº de cat. 109-005-098) a la superficie del chip sensor para la presentación del anticuerpo contra IL-18Rα<sub>h</sub>. Tras la captura de 1 a 6 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-IL-18Rα<sub>h</sub>, se bloqueó la capacidad de unión libre de los anticuerpos de captura durante 4 minutos con 250 µg/ml de inmunoglobulinas de ratón o humanas (Jackson ImmunoResearch 015-000-003 ó 009-000-003), seguido de la inyección de 2,5 µg/ml de IL-18Rα<sub>h</sub> (quimera de Fc<sub>h</sub>, R&D Systems, nº de cat. 816-LR) durante 2 minutos. Se analizó la unión de 0,6 a 3 µg/ml de segundo anticuerpo anti-IL-18Rα<sub>h</sub> mediante la inyección durante 2 minutos; se midió la disociación mediante lavado con tampón durante 2 minutos. El ensayo y las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. Se referenció la unión específica del segundo anticuerpo anti-IL-18Rα<sub>h</sub> respecto a la transferencia realizada con el mismo diseño de chip aunque únicamente sin la inyección de IL-18R<sub>h</sub>. Los datos de competición cruzada se han calculado en porcentaje (%) de la respuesta de unión esperada del segundo anticuerpo anti-IL-18Rα<sub>h</sub>. La expresión "porcentaje (%) de la respuesta de unión esperada" para la unión del segundo anticuerpo se calculó como "100 \* respuesta relativa (estabilidad\_muestra\_tardía)/rMax", en donde rMax se calcula como "respuesta relativa de antígeno (estabilidad\_general\_tardía) \* peso molecular del anticuerpo/peso molecular del antígeno", tal como se describe en las instrucciones de mapeado de epítomos del Biacore (para el instrumento BIACORE® A100). Se muestran los resultados en la Tabla 4a.

45 Tabla 4a: Porcentaje de la respuesta de unión esperada para el anticuerpo 2

Anticuerpo 1	Anticuerpo 2		
	mAb 1G12	mAb 2D11	EM
mAb 1G12	0	0	52
mAb 2D11	0	0	48
EM	76	76	0

EM: anticuerpo de secuencia SEC ID nº 3 y 4 del documento nº WO 2007/096396.

La unión entre 1G12 y 2D11 no era detectable, debido a que se unen dentro de la misma agrupación de epítomos, mientras que la unión de "MS" era detectable (listada en (%) de respuesta de unión esperada del segundo anticuerpo anti-IL-18Rα<sub>h</sub>), demostrando que "MS" se une a una agrupación de epítomos diferente de 1G12 y 2D11. Además, la unión de "MS" no era detectable en el caso de que "MS" se encontrase preunido.



En un segundo experimento, se comparó la unión de los anticuerpos según la invención con el mAb 840 anti-IL-18R $\alpha$  (R&D Systems). Se muestran los resultados en la Tabla 4a.

Tabla 4a: Porcentaje de la respuesta de unión esperada para el anticuerpo 2

Anticuerpo 1	Anticuerpo 2		
	F20.1G12	F20.2D11	mAb840
mAb1G12	5	5	97
mAb2D11	5	5	97
mAb840	119	121	13

La unión entre 1G12 y 2D11 no era detectable, debido a que se unen dentro del mismo epítipo, mientras que mAb 840 se une a un epítipo diferente que 1G12 y que 2D11.

Ejemplo 6

a) Ensayo FACS de células HEK293 transfectadas con IL-18R $\alpha$ /IL-18R $\beta$  humanas:

Se transfectaron 10<sup>6</sup> células HEK293 con un plásmido que expresaba IL-18R $\alpha$  + IL-18R $\beta$  humanas. Las células transfectadas se incubaron durante 1 día. Se incubaron 1x10<sup>5</sup> células sobre hielo en tampón PBS + FCS al 2% y se tiñeron con anticuerpo de IL-18R $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml). A modo de anticuerpo secundario se añadió anti-IgG1 de ratón-PE de R&D Systems (F0102B) en una dilución 1:20, y a modo de isotipo de control, se utilizó IgG1 de ratón de BD Pharmingen (n° 557273) a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. Los resultados en la fig. 1 muestran que los anticuerpos 1G12 (F20.1G12) y 2D11 (F20.2D11) se unen ambos a células transfectadas y que expresan las subunidades IL18R $\alpha$  + IL-18R $\beta$  humanas.

b) Ensayo FACS de células HEK293 transfectadas con IL-18R $\alpha$ /IL-18R $\beta$  de Cynomolgus:

Se transfectaron 10<sup>6</sup> células HEK293 con un plásmido que expresaba IL-18R $\alpha$  + IL-18R $\beta$  de mono Cynomolgus. Las células transfectadas se incubaron durante 1 día. Se incubaron 10<sup>5</sup> células sobre hielo en tampón de PBS + FCS al 2% y se tiñeron con anticuerpo de IL-18R $\alpha$  a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. A modo de anticuerpo secundario se añadió anti-IgG1 de ratón-PE de R&D Systems (F0102B) en una dilución 1:20, y a modo de isotipo de control, se utilizó IgG1 de ratón de BD Pharmingen (n° 557273) a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. Los resultados en la fig. 2 muestran que los anticuerpos 1G12 (F20.1G12) y 2D11 (F20.2D11) se unen ambos a células transfectadas y que expresan las subunidades IL18R $\alpha$  + IL-18R $\beta$  de Cynomolgus.

Ejemplo 7

ELISA celular de células CHO que expresan IL-18R $\alpha$  de mono Cynomolgus o IL-18R $\alpha$  y beta de mono Cynomolgus

Las líneas celulares recombinantes CHO-K1 que expresaban IL-18R $\alpha$  de mono Cynomolgus o IL-18R $\alpha$ + $\beta$  de mono Cynomolgus se tiñeron con los anticuerpos mAb\_IL-18R en una ELISA celular. Los controles eran células CHO-K1 no transfectadas. Las células se cultivaron en medio F-12 (GIBCO) con Glutamax-1 (GIBCO n° de cat. 31331-028) + FCS al 10% (PAN n° de cat. 2802-P920707). Para el cultivo de las líneas celulares recombinantes, se añadieron 250  $\mu$ g/ml de G418 (geneticina, GIBCO, n° de cat. 10131-019). A modo de anticuerpo de control, se añadió anticuerpo mAb840 anti-hIL-18R $\alpha$  (IgG1 monoclonal de ratón de R&D Systems, n° de cat. mAb 840) y a modo de anticuerpo de detección se añadió conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L)-HRP (BioRad). Para la realización del ensayo, el día 1, se sembraron 2x10<sup>4</sup> células CHO\_CynoIL-18R $\alpha$ , CHO\_CynoIL-18R $\alpha$ + $\beta$  o CHO en 50  $\mu$ l de F-12/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C. El día 2, se añadieron 50  $\mu$ l de sobrenadante o de anticuerpo purificado (2X) diluido en medio ó 50  $\mu$ l de sobrenadante de hibridoma, y se incubó durante 2 horas a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de solución de fijación de glutaraldehído (solución madre al 25%, grado EM; concentración final=al 0,05% en PBS) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para el lavado, se añadieron y sacaron 200  $\mu$ l de PBS/pocillo 2 veces. Se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo de detección de ELISA diluido en reactivo de bloqueo de ELISA (reactivo madre de bloqueo de ELISA diluido 1:10 en PBS). Se añadió conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H y L)-HRP diluido 1:2.000 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador. Se aspiró la solución y se llevó a cabo el lavado 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS. Se añadieron 50  $\mu$ l de TMB durante 7 a 10 minutos (hasta desarrollarse el color azul). Se detuvo la reacción mediante la adición de 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Se midieron las MTP a 450 nm-620 nm utilizando un lector de ELISA (TECAN). Se muestran los resultados en la Tabla 5. No se observó unión con las células no transformadas.

Tabla 5:

Anticuerpo	CHO CyIL-18R $\alpha$ EC <sub>50</sub> (ng/ml)	CHO CyIL-18R $\alpha$ + $\beta$ EC <sub>50</sub> (ng/ml)
mAb 1G12	18,58	15,01

'Reg'	185,44	139,46
'MS'	≥ 1000,00	≥1000,00

Resulta importante para la investigación toxicológica y para el ensayo de FC/FD que el anticuerpo reconozca el IL-18R $\alpha$  Cyno con una EC<sub>50</sub> similar a la de su unión al IL-18R $\alpha$  humano.

### 5 Ejemplo 8

Investigación de la producción de IFN $\gamma$  inducida por IL-18 en PBMC humanas

10 La IL-18 presenta una función biológica en las células asesinas naturales (NK) y en la activación de las células TH1, por ejemplo mediante la inducción del interferón gamma (IFN $\gamma$ ) en las células CD4<sup>+</sup> y en otras células T, células B, células NK y monocitos. IL-18 también sinergiza con IL-12 en la inducción de IFN $\gamma$  en células T humanas (sin unión del TCR) de manera similar a IL-1 $\beta$  (Tominaga K. *et al.*, Int. Immunol. 12:151-160, 2000). En este caso el mecanismo está asociado a la expresión inducida por IL-12 de la cadena IL-18R $\alpha$ , tal como se describe para las células TH1 pero no para las TH2. Para evaluar el impacto funcional de los mAb anti-IL-18, tanto contra el receptor como contra el  
15 ligando, se aislaron células mononucleares sanguíneas periféricas mediante la técnica de Ficoll-Paque. Se precultivaron 2x10<sup>5</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (volumen: 200  $\mu$ l) en presencia de 5 ng/ml de IL-12 (Sigma) durante 3 días. A continuación, se añadió IL-18 (MBL, <http://www.mblintl.com/>) a una concentración final de 10 ng/ml durante 3 días adicionales. En este punto, para bloquear el receptor o neutralizar el ligando, se añadieron mAb anti-IL18R a una concentración final de entre 0,01 y 0,5/1,0  $\mu$ g/ml. Tras un total de 6 días, se analizó  
20 la producción de IFN $\gamma$  en sobrenadante mediante ELISA. Se muestran los resultados en la Tabla 6.

Tabla 6:

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> [ng/ml]
mAb 1G12	0,76 $\pm$ 0,5
mAb 2D11	1,71 $\pm$ 0,3
Reg	2,3 $\pm$ 3,2
EM	2,6 $\pm$ 2,4

### 25 Ejemplo 9

Unión de anticuerpos a IL-18R $\alpha$ \_hu y a otras proteínas de la familia de receptores de IL-1 (ELISA)

30 Se llevó a cabo el ensayo en placas de microtitulación de 384 pocillos (MaxiSorp<sup>TM</sup>, Thermo Scientific Nunc, DK, n° de cat. 464718) a TA. Tras cada etapa de incubación, se lavaron las placas 3 veces con PBST. Al inicio, las placas se recubrieron con 0,5  $\mu$ g/ml de fragmento Fc de cabra anti-IgG humana (Jackson Imm. Res., US, n° de cat. 109-006-170) durante por lo menos 2 horas (h). A continuación, se bloquearon los pocillos con PBS complementado con Tween<sup>®</sup>-20 al 0,2% y BSA al 2% (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h. Se capturaron 0,2  $\mu$ g/ml de quimera de IL18R $\alpha$ -Fc recombinante humana (R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 816-LR) en una placa durante 1 h. Para el ensayo de la unión de los anticuerpos a otras proteínas de la familia de receptores de IL-1, se conjugaron 0,2  
35  $\mu$ g/ml de las proteínas humanas recombinantes siguientes a Fc humana (Fc\_h):

IL-1RI_rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 269-1R)
IL-1sRII_rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 263-2R)
IL-1R3_rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 676-CP)
IL-2R $\alpha$ _rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 1020-RL)
IL-7R $\alpha$ _rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 306-IR)
IL-15R_rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 147-IR)
ST-2_rh/Fc_h	(R&D Systems, Reino Unido, n° de cat. 523-ST)

40 Tras el lavado, las diluciones de la placa de anticuerpos purificados en PBS con BSA al 0,05% y Tween<sup>®</sup>-20 al 0,2% se incubaron con las proteínas receptoras durante 1 h. Se detectó la unión de los anticuerpos con 1: conjugados de peroxidasa de rábano picante (HRP) diluidos 1:2.000 de anticuerpo anti-IgG de ratón (GE Healthcare, Reino Unido, n° de cat. NA9310V). Tras 1 hora, las placas se lavaron 6 veces con PBST y se revelaron con solución de sustrato de POD BM blue<sup>®</sup> recién preparada (BM blue<sup>®</sup>: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Roche Diagnostics GmbH, DE, n° de cat. 11484281001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 370 nm. Se corrigieron los valores para el control sin anticuerpo. Se muestran los resultados en la Tabla 7.

45

Tabla 7: ("IL-1RI\_rh" se refiere a "IL-1RI\_rh/Fc\_h", etc.)

Anticuerpo	IL-1RI_rh	IL-1sRII_rh	IL-1R3_rh	IL-2R $\alpha$ _rh	IL-7R $\alpha$ _rh	IL-15R_rh	ST-2_rh	IL-18R $\alpha$ _rh
mAb 1G12	0,01	-0,03	0,00	-0,01	-0,01	0,04	-0,01	2,43
mAb 2D11	0,02	-0,05	0,02	0,02	-0,01	0,19	0,02	2,56

Ejemplo 10

## Internalización de receptores

- 5 Se estimularon las células KG-1 durante la noche con 10 ng/ml de TNFalfa para inducir la expresión de IL18R. A continuación se incubaron las células con anticuerpos anti-IL18R durante diferentes periodos de tiempo, seguido de: a) la detección del anticuerpo unido, o b) la determinación de la expresión superficial de IL18R. Ninguno de los anticuerpos sometidos a ensayo según la invención (2D11, 1G12) indujeron la internalización o regulación negativa de receptores.

10

Ejemplo 11Ensayo de TH<sub>1</sub> humana

- 15 Se aislaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) a partir de voluntarios sanos utilizando un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Tras el lavado de las células con RPMI se resuspendieron en PBS, pH 7,2, con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Se aislaron las células T de PBMC utilizando el kit de aislamiento Pan de células T (Miltenyi Biotec) y la separación magnética con un separador AutoMACS™. Las células T enriquecidas se lavaron 3 veces con RPMI 1640 (complementado con FCS al 10%, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, tampón HEPES, piruvato sódico y Pen/Strep), se resuspendieron y se sembraron a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml en placas de 6 pocillos de fondo redondo recubiertas con 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD3, se incubaron durante 4 días a 37°C con 1 µg/ml anticuerpo anti-CD28 soluble (BD Biosciences), 10 ng/ml de IFN-γ, 30 ng/ml de IL-12 y 10 µg/ml de anticuerpo anti-IL-4 (Peprotech). A continuación, las células se lavaron con RPMI completo 2 veces y después se dejaron en reposo a una densidad de 2x10<sup>6</sup> células/ml en RPMI completo con IL-2 recombinante (50 unidades/ml). Las células se trataron posteriormente con Ab anti-IL-18Rα diluido en serie o Ab de isotipo de control (0 a 1 µg/ml) durante 30 minutos, después se reestimularon con 10 ng/ml de IL-18, 2 ng/ml de IL-12 (Peprotech), a una densidad de 1x10<sup>5</sup> células por pocillo, se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche. Se recogieron los sobrenadantes para el análisis de ELISA de IFN-γ utilizando el kit ELISA de IFN-γ BD OptEIA (nº de cat. 555142). (BD Biosciences). Se leyó la absorbancia utilizando un lector de microplacas Spectromax y se analizaron los datos utilizando PRISM (software GraphPad). Se muestran los resultados en la Tabla 8a.

30

Tabla 8a:

Anticuerpo	IC <sub>90</sub> del ensayo de TH <sub>1</sub> humana [pM]
mAb1G12	76,2
mAb2D11	87,1
'MS'	2914,5
Reg	2832,0

- 35 Los desequilibrios de Th1/Tc1 y de Th2/Tc2 participan en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); las células Th1/Tc1 expresan un nivel elevado de IL-18Rα y la función de las células T periféricas se correlaciona con la severidad de la EPOC (Zhu X. *et al.*, J. Immunol. 182:3270-3277, 2009; Freeman C.M. *et al.*, J. Immunol. 184:6504-6513, 2010; Shirai T. *et al.*, Allergol. Int. 59:75-82, 2010). Dicho ensayo se centra en las células T, en el que éstas son activadas y se cultivan en Th1 y expresan un nivel elevado de IL-18Rα; por lo tanto, dicho ensayo requiere la máxima cantidad de Ab anti-IL-18Rα para la neutralización. Los anticuerpos según la invención muestran valores de IC<sub>90</sub> mejorados en dicho ensayo de TH1 humana y por lo tanto, son compuestos valiosos para el tratamiento de las enfermedades dependientes de TH1.

40

En un segundo experimento, se determinaron los valores de IC<sub>90</sub> en dicho ensayo de TH1 humanas para los anticuerpos humanizados. Se muestran los resultados en la Tabla 8b.

45

Tabla 8b:

Anticuerpo	IC <sub>90</sub> del ensayo de TH1 humanas [pM]
mAb1G12-9.6	148,4
mAb1G12-10.5	283,2
mAb1G12-10.6	93,5
mAb1G12-11.6	77,0
mAb1G12-12.6	399,4
'MS'	1431,57
Reg	2361,87

Además, los anticuerpos humanizados según la invención muestran valores de IC<sub>90</sub> mejorados en dicho ensayo de TH1 humanas y por lo tanto son compuestos valiosos para el tratamiento de dichas enfermedades.

Ejemplo 12

5

Descripción del ensayo de sangre completa de la COPD primaria humana

10

Se recogió sangre periférica de pacientes sanos no fumadores y de pacientes con EPOC (estadio Gold II-IV) en tubos con heparina sódica, se trataron con anticuerpo anti-IL-18R $\alpha$  diluido en serie o con Ab de isotipo de control (0 a 0,5  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos y después se estimularon con 10 ng/ml de IL-18 y 2 ng/ml de IL-12, en placas de 96 pocillos a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche. Se peletizaron las células y se recogieron los sobrenadantes para el análisis de ELISA de IFN gamma utilizando el kit ELISA de IFN-gamma humano BD OptEIA (nº de cat. 555142). (BD Biosciences). Se leyó la absorbancia utilizando un lector de microplacas Spectromax y se analizaron los datos utilizando PRISM (software GraphPad). Se muestran los resultados en la Tabla 9.

15

Tabla 9:

Anticuerpo	IC <sub>90</sub> del ensayo de transf. western humano de pacientes con EPOC [pM]	IC <sub>90</sub> del ensayo de transf. western humano de pacientes no fumadores sanos [pM]
mAb1G12	42,1	12,2
mAb2D11	-	19,2
'MS'	-	33,0
'Reg'	-	21,6

Ejemplo 13

20

Unión de mAb 1G12 y mAb 2D11 a variantes de IL-18R

25

Para la investigación del sitio de unión de anticuerpo, se clonó y se expresó IL-18R $\alpha$  en forma de proteína de fusión de Fc (bisagra de IgG1 humana hasta CH3). IL-18R $\alpha$  está compuesto de 3 dominios de tipo Ig: D1, D2 y D3 (Swiss Prot. nº de acc. Q13478). De esta manera, se generaron varias variantes y mutantes y se sometió a ensayo la unión residual de las Abs 1G12 y 2D11. Se introdujeron mutaciones mediante el intercambio de secuencias del IL-18R $\alpha$  humana y secuencias correspondientes de IL-18R $\alpha$  de ratón. Se llevaron a cabo delecciones mediante la clonación y expresión separadas de dominios en forma de proteínas de fusión de Fc humana. Además, se clonó IL-18R $\alpha$  de Cynomolgus en forma de proteína de fusión de Fc humana. Se muestran los resultados en la Tabla 8. La unión de anticuerpos a diferentes variantes de IL-18R $\alpha$  se midió mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) utilizando un instrumento BIAcore<sup>®</sup> 3000 (GE Healthcare) a 25°C. Se llevó a cabo un acoplamiento de aminas de aproximadamente 500 unidades de resonancia (UR) de un sistema de captura (que capturaba mAb específico para la IgG humana, Jackson ImmunoResearch/109-005/098) en un chip CM3 a pH 5,0 utilizando un kit de acoplamiento de aminas suministrado por GE Healthcare. Para el análisis, se capturaron diferentes variantes de IL18R $\alpha$  etiquetadas con Fc humanas mediante la inyección de una solución 10  $\mu$ g/ml durante 2 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/minuto. Se bloqueó el exceso de sitios de unión mediante la inyección de una mezcla de Fc humanas a una concentración de 1,25  $\mu$ M (Biodesign, nº 50175). A continuación, se inyectó el anticuerpo que debía someterse a ensayo, a una concentración de 0,2  $\mu$ g/ml durante 3 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/minuto. Se realizó un seguimiento de la etapa de disociación durante un máximo de 5 minutos y se indujo mediante el cambio de solución de muestra a tampón de migración. En el caso del ensayo de los ligandos naturales IL-18 y IL18R $\beta$ , se inyectó una mezcla de ambas proteínas a una concentración de 100 nM tal como se ha indicado anteriormente para un anticuerpo. Se regeneró la superficie mediante un lavado de 1 minuto con una solución de ácido fosfórico 100 mM seguido de un lavado de 1 minuto con 5 ml de NaOH 5 mM a un caudal de 10  $\mu$ l/minuto. Se corrigieron las diferencias mayores de índice refractivo mediante la sustracción de la respuesta procedente de una superficie con acoplamiento de un blanco. También se sustrajeron las inyecciones de blanco (=doble referenciado) Las variantes de IL18R $\alpha$  que se unen a anticuerpos comparables al IL18R $\alpha$  de tipo salvaje no influyen sobre la unión de dichos anticuerpos y por lo tanto se concluye que las mutaciones insertadas/modificadas no contribuyen a la unión (marcadas con + en la Tabla 7). La unión influida se refiere a que la señal de unión se ha reducido en 20% a 50% en comparación con la señal de unión observada con el tipo salvaje. Una unión débil se refiere a una unión clara 10% superior a la señal pero inferior en un 50% a la descrita para el receptor de tipo salvaje (indicado como 0). En el caso de que no se detecte unión, se señala con – en la Tabla 10.

50

Mutaciones y variantes de IL-18R $\alpha$ \_sh:Fc

1. Tipo salvaje IL-18R $\alpha$ \_sh:Fc de tipo salvaje
2. Cyno IL-18R $\alpha$ :Fc de Cynomolgus

- 3. D3 Delección D1/D2; D3 residual
- 4. D1-1 Mutación D1 SRIAL a PRVTF
- 5. D1-2 Mutación D1 MKNYTQK a VGNDRRN
- 6. D2-1 Mutación D2: QTLVNSTS a EELIQDTW
- 7. D2-2 Mutación D2: NPTIKKN a TPRILKD
- 8. D2-3 Mutación D2: HFLHHNGKLF a FSVHHNGTRY

Tabla 10:

	1G12	2D11	Reg	EM	IL-18 / IL-18R $\beta$ (control)
1. WT	+	+	+	+	+
2. Cyno	+	+	+	+	+
3. D3	-	-	+	+	
4. D1-1	+	+	+	+	+
5. D1-2	+	+	+	+	+
6. D2-1	+	+	n.d.	n.d.	+
7. D2-2	+	+	n.d.	n.d.	+
8. D2-3	+	+	n.d.	n.d.	+

Leyenda: + = unión  
 +/- = unión reducida  
 0 = unión débil  
 -= sin unión detectable

Ejemplo 14

5

Ensayo de unión de péptidos IL-18R

Se investigó la unión de anticuerpos a los péptidos indicados como SEC ID n° 5 y 6 en el documento n° US 2008/0063644. Estos péptidos se biotinilaron en el extremo N-terminal y se sondearon para la unión mediante RPS. Se midió la unión de anticuerpos a dichos péptidos mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) utilizando un instrumento BIAcore® 3000 (GE Healthcare) a 25°C y HBS-P+ como tampón de migración y de dilución. Los péptidos biotinilados se inmovilizaron en un chip SA mediante la inyección de varios pulsos (60 segundos) de una solución de péptidos 10 nM rindiendo una respuesta de 40 UR. La superficie de referencia, así como las superficies recubiertas, se desactivaron mediante la inyección de biotina libre a una concentración de 1  $\mu$ M. Para el análisis, el anticuerpo que debía analizarse se inyectó a una concentración de 100 nM durante 3 min. a un caudal de 10  $\mu$ l/min. Se realizó un seguimiento de la etapa de disociación durante un máximo de 2,5 min. y se indujo mediante el intercambio de la solución de muestra por solución de migración. Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie con acoplamiento de un blanco. También se sustrajeron las inyecciones de blanco (=doble referenciado) En el caso del anticuerpo mAb 1G12 no pudo detectarse unión a dichos péptidos.

10

15

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

25

<120> Anticuerpos contra IL-18R1 y usos de los mismos

<130> 26956 WO

30

<150> EP 10174039.7

<151> 2010-08-25

<160> 72

35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

40

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 553 262 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Thr Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 2  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 2

Asp Tyr Thr Phe Thr  
 1 5

15 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 3

Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

20 Gly

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT

ES 2 553 262 T3

<213> Mus musculus

<400> 4

5                   Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val  
                  1                                   5                                   10

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 5

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Gly Val Ser Leu Gly  
1                                   5                                   10                                   15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
                  20                                   25                                   30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
                  35                                   40                                   45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
50                                   55                                   60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65                                   70                                   75                                   80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
                  85                                   90                                   95

Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
                  100                                   105                                   110

15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 6

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His  
1                                   5                                   10                                   15

25

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400> 7

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1                                   5

ES 2 553 262 T3

<210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

Gln Gln Ser Arg Glu Leu Pro Leu Ser  
 1 5

10

<210> 9  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25

<400> 10

Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Asn Trp Met His  
 1 5 10



ES 2 553 262 T3

<210> 11  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 11

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Gly Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

10 <210> 12  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

15 <400> 12

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

ES 2 553 262 T3

	35		40		45														
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser				
	50					55					60								
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu				
	65				70					75					80				
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser				
				85					90					95					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
			100					105											

5 <210> 13  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 13

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

10 <210> 14  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 15 <213> homo sapiens  
 <400> 14

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys				
1				5					10					15					

ES 2 553 262 T3

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

ES 2 553 262 T3

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 15  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

5

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

10

ES 2 553 262 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 16  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

5

<400> 16

ES 2 553 262 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1                           5                           10                           15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                  20                           25                           30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
          35                           40                           45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50                           55                           60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

ES 2 553 262 T3

```

65                                70                                75                                80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85                                90                                95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100                               105                               110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115                               120                               125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130                               135                               140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145                               150                               155                               160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165                               170                               175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180                               185                               190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195                               200                               205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210                               215                               220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225                               230                               235                               240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                               250                               255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                               265                               270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                               280                               285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                               295                               300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                               310                               315                               320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325                               330

```

ES 2 553 262 T3

<210> 17  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

5

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220



ES 2 553 262 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 18  
<211> 327  
5 <212> PRT  
<213> homo sapiens

<400> 18

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

10

ES 2 553 262 T3

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 19  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 553 262 T3

<400> 19

**Ser Arg Ile Ala Leu**  
1 5

5

<210> 20  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 20

**Pro Arg Val Thr Phe**  
1 5

15

<210> 21  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20

<400> 21

**Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys**  
1 5

25

<210> 22  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30

<400> 22

**Val Gly Asn Asp Arg Arg Asn**  
1 5

35

<210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

40

**Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser**  
1 5

45

<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

50

**Glu Glu Leu Ile Gln Asp Thr Trp**  
1 5

55

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

ES 2 553 262 T3

<400> 25

**Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn**  
**1 5**

5 <210> 26  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 26

**Thr Pro Arg Ile Leu Lys Asp**  
**1 5**

15 <210> 27  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 27

**His Phe Leu His His Asn Gly Lys Leu Phe**  
**1 5 10**

25 <210> 28  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28

**Phe Ser Val His His Asn Gly Thr Arg Tyr**  
**1 5 10**

30 <210> 29  
<211> 121  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> región variable de cadena pesada (VH) de mAb humanizado mAb 1G12-9.6

40 <400> 29

ES 2 553 262 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 30  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDRH1 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-9.6

<400> 30

**Asp Tyr Thr Phe Thr**  
**1 5**

15 <210> 31  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDRH2 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-9.6

<400> 31

25 **Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Gln**  
**1 5 10 15**

**Gly**

30 <210> 32  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 553 262 T3

<220>

<223> CDRH3 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-9.6

<400> 32

5

Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 33

<211> 111

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera (VL) de mAb humanizado 1G12-9.6

15

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ile Pro Asp  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

20

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> CDRL1 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-9.6

<400> 34

30

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His  
1 5 10 15

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Artificial

ES 2 553 262 T3

<220>

<223> CDRL2 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-9.6

<400> 35

5

**Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr**  
**1 5**

<210> 36

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRL3 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-9.6

15

<400> 36

**Gln Gln Ser Arg Glu Leu Pro Leu Ser**  
**1 5**

20

<210> 37

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> región variable de cadena pesada (VH) de mAb humanizado 1G12-10.5

<400> 37

**Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**

**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Asn**  
**20 25 30**

**Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met**  
**35 40 45**

**Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe**  
**50 55 60**

**Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr**  
**65 70 75 80**

**Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**85 90 95**

**Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly**  
**100 105 110**

30

**Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser**  
**115 120**

ES 2 553 262 T3

<210> 38  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> CDRH1 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-10.5  
 <400> 38  
 10  
                                   **Asp Tyr Thr Phe Thr**  
                                   **1                                  5**  
 <210> 39  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> CDRH2 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-10.5  
 20  
 <400> 39  
           **Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Gln**  
           **1                                  5                                  10                                  15**  
           **Gly**  
 25 <210> 40  
       <211> 12  
       <212> PRT  
       <213> Artificial  
 30 <220>  
       <223> CDRH3 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-10.5  
       <400> 40  
                                   **Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val**  
 35                                  **1                                  5                                  10**  
 <210> 41  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región variable de cadena ligera (VL) de mAb humanizado 1G12-10.5  
 45 <400> 41



ES 2 553 262 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 42  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDRL1 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-10.5  
 <400> 42

Gln Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His  
 1 5 10 15

15 <210> 43  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDRL2 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-10.5  
 <400> 43

25 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

30 <210> 44  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> CDRL3 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-10.5

ES 2 553 262 T3

<400> 44

Gln Gln Ser Arg Glu Leu Pro Leu Ser  
1 5

5 <210> 45  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> región variable de cadena pesada (VH) de mAb humanizado 1G12-10.6

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
20 25 30

15 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

20 <210> 46  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> CDRH1 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-10.6

<400> 46

Asp Tyr Thr Phe Thr  
1 5

30 <210> 47  
<211> 17

ES 2 553 262 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> CDRH2 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-10.6

<400> 47

**Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Gln**  
**1 5 10 15**

10 **Gly**

<210> 48  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> CDRH3 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-10.6

<400> 48

20 **Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val**  
**1 5 10**

<210> 49  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> región variable de cadena ligera (VL) de mAb humanizado 1G12-10.6

30 <400> 49

ES 2 553 262 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 50  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> CDRL1 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-10.6  
 <400> 50

10

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His  
 1 5 10 15

<210> 51  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> CDRL2 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-10.6 7  
 <400> 51

20

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

25

<210> 52  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30

ES 2 553 262 T3

<220>

<223> CDRL3 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-10.6

<400> 52

5

Gln Gln Ser Arg Glu Leu Pro Leu Ser  
1 5

<210> 53

<211> 121

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada (VH) de mAb humanizado 1G12-11.6

15

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

20

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> CDRH1 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-11.6

30

<400> 54

ES 2 553 262 T3

Gly Tyr Thr Phe Thr  
1 5

5 <210> 55  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDRH2 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-11.6  
<400> 55

Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

15 <210> 56  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> CDRH3 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-11.6  
<400> 56

25 Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

30 <210> 57  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> región variable de cadena ligera (VL) de mAb humanizado 1G12-11.6  
35 <400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ile Pro Asp  
50 55 60

ES 2 553 262 T3

**Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser**  
**65 70 75 80**

**Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg**  
**85 90 95**

**Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys**  
**100 105 110**

5 <210> 58  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDRL11 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-11.6  
<400> 58

**Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His**  
**1 5 10 15**

15 <210> 59  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> CDRL2 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-11.6  
<400> 59

25 **Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr**  
**1 5**

30 <210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> CDRL3 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-11.6  
<400> 60

**Gln Gln Ser Arg Glu Leu Pro Leu Ser**  
**1 5**

40 <210> 61  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> región variable de cadena pesada (VH) de mAb humanizado 1G12-12.6  
<400> 61

ES 2 553 262 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Thr Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 62  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> CDRH1 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-12.6  
 <400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr  
 1 5

15 <210> 63  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDRH2 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-12.6  
 <400> 63

Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Leu Gln  
 1 5 10 15

25 Gly

<210> 64



ES 2 553 262 T3

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> CDRH3 de cadena pesada de mAb humanizado 1G12-12.6  
 <400> 64

10 Ser Gly Asp Tyr Asp Ala Asp Arg Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

15 <210> 65  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> región variable de cadena ligera (VL) de mAb humanizado 1G12-12.6  
 <400> 65

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

25 <210> 66  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> CDRL1 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-12.6  
 <400> 66

35 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His  
 1 5 10 15

<210> 67  
 <211> 7

ES 2 553 262 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 5 <223> CDRL2 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-12.6

<400> 67

**Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr**  
 1 5

10 <210> 68  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> CDRL3 de cadena ligera de mAb humanizado 1G12-12.6

<400> 68

20 style="text-align: center;">**Gln Gln Ser Arg Glu Leu Pro Leu Ser**  
 1 5

<210> 69  
 <211> 15  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia de consenso de CDRL1

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X es R o Q

35 <400> 69

**Xaa Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Asp Ser Tyr Met His**  
 1 5 10 15

40 <210> 70  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> secuencia de consenso de CDRH1

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <222> (1)..(1)  
 <223> X es D o G

<400> 70

**Xaa Tyr Thr Phe Thr**  
 1 5

55 <210> 71  
 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 553 262 T3

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de CDRH2

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12) .. (16)

<223> X1 es N o A,

10

X2 es F o A, y

X3 es K o Q

<400> 71

Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Xaa Gln Lys Xaa Xaa  
1 5 10 15

15

Gly

<210> 72

<211> 541

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val  
1 5 10 15

Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu  
20 25 30

Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu  
35 40 45

Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu  
50 55 60

His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp  
65 70 75 80

Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr  
85 90 95

25

Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile  
100 105 110

ES 2 553 262 T3

Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys  
 115 120 125

Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr  
 130 135 140

Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys  
 145 150 155 160

Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu  
 165 170 175

Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn  
 180 185 190

Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu  
 195 200 205

Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His  
 210 215 220

Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu  
 225 230 235 240

Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly  
 245 250 255

Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro  
 260 265 270

Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly  
 275 280 285

Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly  
 290 295 300

Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala  
 305 310 315 320

Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu  
 325 330 335

Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg  
 340 345 350

Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr  
 355 360 365

Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu

ES 2 553 262 T3

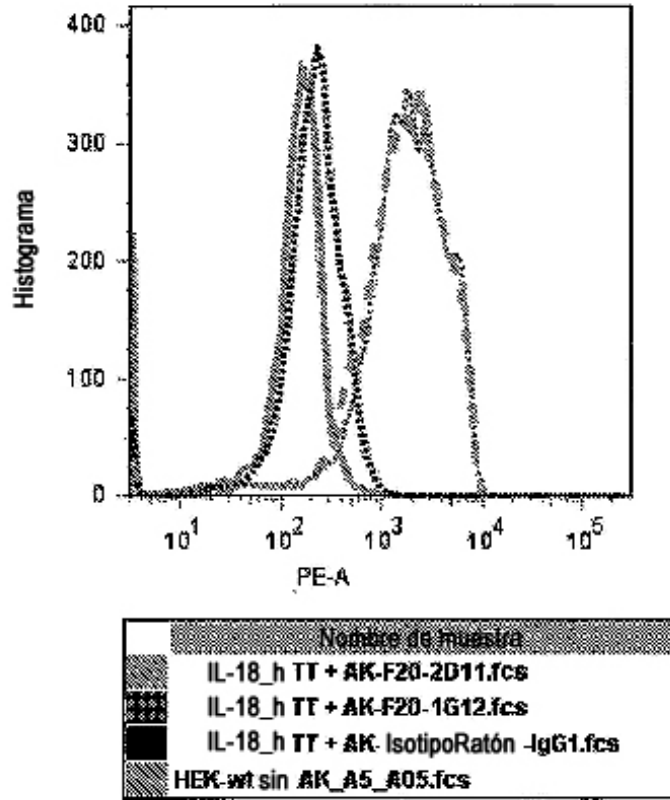
370						375						380				
Cys	Arg	Pro	Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	His	Thr	Phe	Ala	Val	Glu	Ile	Leu	
385					390					395					400	
Pro	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	His	Phe	Gly	Tyr	Lys	Leu	Cys	Ile	Phe	Glu	
				405					410					415		
Arg	Asp	Val	Val	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Ile	His	Ser	Leu	
			420						425				430			
Ile	Glu	Lys	Ser	Arg	Arg	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Met	
		435					440					445				
Ser	Asn	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	His	Glu	Ala	Leu	
	450					455					460					
Val	Glu	Arg	Lys	Ile	Lys	Ile	Ile	Leu	Ile	Glu	Phe	Thr	Pro	Val	Thr	
465					470					475					480	
Asp	Phe	Thr	Phe	Leu	Pro	Gln	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	
				485					490					495		
Val	Leu	Lys	Trp	Lys	Ala	Asp	Lys	Ser	Leu	Ser	Tyr	Asn	Ser	Arg	Phe	
			500					505					510			
Trp	Lys	Asn	Leu	Leu	Tyr	Leu	Met	Pro	Ala	Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Gly	
		515					520					525				
Arg	Asp	Glu	Pro	Glu	Val	Leu	Pro	Val	Leu	Ser	Glu	Ser				
	530					535					540					

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado ligante de IL-18R1 humana y caracterizado por que comprende como las CDR de región variable de cadena pesada una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 10, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 3 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 4, y como CDR de región variable de cadena ligera, una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 6, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 7 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 8.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende como región variable de cadena pesada, la secuencia SEC ID nº 1, y como región variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID nº 5, o como región variable de cadena pesada, la secuencia SEC ID nº 9, y como región variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID nº 11, 11.
3. Anticuerpo aislado ligante de IL-18R1 humano y caracterizado por que comprende como:
- a) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 30, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 31 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 32 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 34, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 35 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 36
  - b) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 38, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 39 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 40 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 42, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 43 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 44
  - c) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 46, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 47 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 48 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 50, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 51 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 52
  - d) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 54, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 55 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 56 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 58, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 59 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 60, o
  - e) como CDR de región variable de cadena pesada, una región CDRH1 de secuencia SEC ID nº 62, una región CDRH2 de secuencia SEC ID nº 63 y una región CDRH3 de secuencia SEC ID nº 64 y como región variable de cadena ligera una región CDRL1 de secuencia SEC ID nº 66, una región CDRL2 de secuencia SEC ID nº 67 y una región CDRL3 de secuencia SEC ID nº 68.
4. Anticuerpo según la reivindicación 3, caracterizado por que comprende:
- a) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 29, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 33,
  - b) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 37, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 41,
  - c) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 45, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 49,
  - d) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 53, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 57, o
  - e) como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 61, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 65.
5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que es del isotipo IgG1 humano, que comprende las mutaciones L234A, que es alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234, y L235A, que es alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 235, en donde las numeraciones son según el índice EU.
6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que es del isotipo IgG4 humano con o sin la mutación S228P, en donde las numeraciones son según el índice EU.
7. Anticuerpo según la reivindicación 6, caracterizado por que comprende las mutaciones S228P y L235E, en donde las numeraciones son según el índice EU.
8. Ácido nucleico codificante del anticuerpo según cualquiera de las realizaciones 1 a 7.
9. Célula huésped que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8.

10. Método para la producción de un anticuerpo recombinante ligante de IL-18R1, caracterizado por que expresa un ácido nucleico según la reivindicación 8 en una célula huésped procariótica o eucariótica y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular.
- 5 11. Formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización como medicamento.
- 10 13. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la utilización en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, lupus, soriasis o enfermedades óseas.
- 15 14. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que se encuentra parcialmente fucosilado o no fucosilado.
- 20 15. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la utilización en el bloqueo de la interacción entre IL-18 e IL-18R1 y el bloqueo de la formación de complejo entre IL-18R1 e IL18RAP y la inhibición de la señalización mediada por el complejo de receptor de IL-18 y la activación de la ruta de NFkappaB.

**Fig. 1**





**Fig. 2**

