

BT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
INVENTARIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No **08-116888**

54 TITULO **"ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18
HUMANIZADOS MODIFICADOS"**

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL **C07K 16/24**

71 SOLICITANTE **GLAXO GROUP LIMITED**

DOMICILIO **MIDDLESEX, INGLATERRA**

74 REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLORED A RICAURTE**
T P 53 215

22 BOGOTA, D C

(FORMA P 10)

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-116888- -00000-0000

Fecha: 2008-10-31 16:26:49 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 165

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

25 dic 2008

① SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
② SOLICITANTE (71)	Nombre: GLAXO GROUP LIMITED Dirección: Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN, Inglaterra. Nacionalidad o Domicilio: Middlesex, Inglaterra. Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ELLIS, Jonathan Henry; GERMASCHEWSKI, Volker; HAMBLIN, Paul Andrew y KIRBY, Ian. Dirección: GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY. Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.		
④ INVENTOR(ES) (72)			
⑤ PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2007/055029</u> Fecha: <u>23/05/07</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2007/137984 A3</u> Fecha: <u>06/12/07</u>			
⑥ Título (54) "ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS MODIFICADOS"			
⑦ Clasificación Internacional (51) C07K 16/24			
⑧ Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	GB	25/05/06	0610438.4
	GB	05/06/06	0611046.4
⑨ Comprobante de Pago No. <u>08-79.765</u> Fecha: <u>7 de Octubre de 2008</u>			

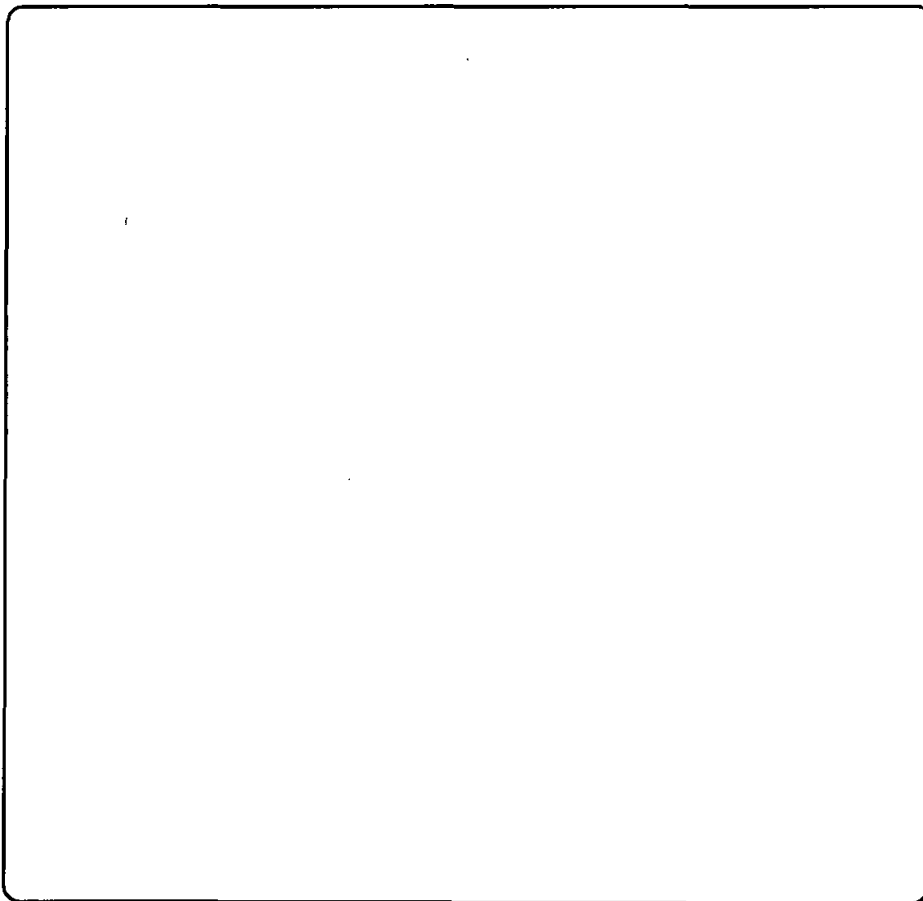
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

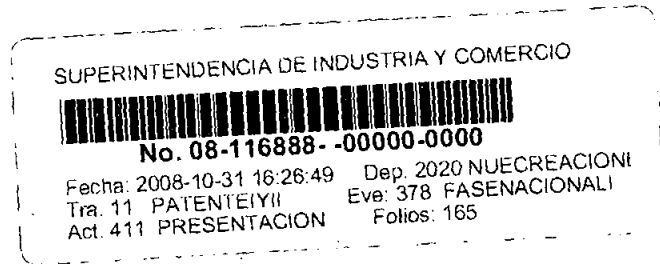
C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 79,765
FECHA : OCTUBRE 7 DE 2008



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	4891946	07/10/2008	11,020,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINTIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.

Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

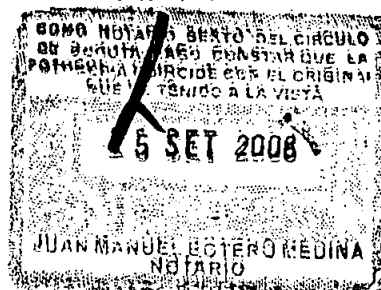
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público
3. ha sido firmado por Martin E Buchner
4. actuando como Notario Público
5. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

6. en Londres
7. el 26 de agosto de 2004
8. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
9. Número G499865
10. Sello/Estampilla
11. Firma: (ilegible)
12. Sello de la Oficina de Asuntos
13. M. Monaghan

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

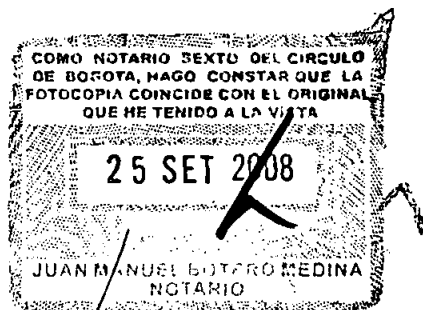
2008 SET -3 P 12:12

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258650

Ana Escobar
COYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



Exteriores y del Commonwealth

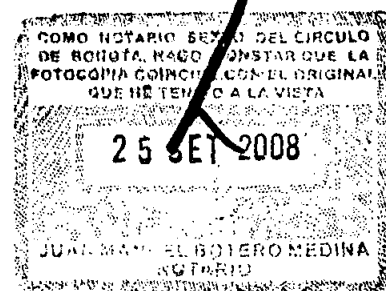
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **Martin Emil BUCHNER**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

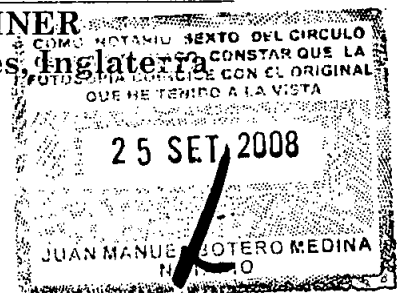
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**GLAXO GROUP LIMITED**", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.


Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

- 1 Country United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays Royaume Uni de Grande Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

- 2 Has been signed by **Martin F Buchner**
a été signé par

- 3 Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

- 4 Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Atteste
6 the/le **26 August 2004**

- 7 by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth

- 8 Number/sous No **G499865**

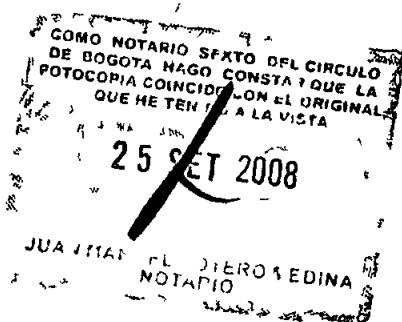
- 9 Stamp
timbre

- 10 Signature **M Monaghan**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961 it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



abajo firmados, **GLAXO GROUP LIMITED**, una
sociedad organizada y existente de conformidad con
las leyes de Inglaterra y Gales..

con domicilio en **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Inglaterra

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA** y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o **IGNACIO SANTAMARIA**
y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá,
Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No.
5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y
verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al
parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de
1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO**
TAMAYO y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE**
ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos
designare, quedan especialmente facultados para
representarnos ante las autoridades colombianas,
administrativas, judiciales o de policía, en todos los
trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo
efecto les facultamos para dar ante dichas
autoridades todos los pasos necesarios al objeto
indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos,
recursos y presentar desistimientos; formular
descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las
solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones;
instaurar cancelaciones, renunciar total o
parcialmente a los registros, abonar todos los
impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago
determinado por la ley; recibir todos los documentos
y valores, dando el descargo respectivo; llenar
cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas
las medidas que creyeran conducentes al resguardo
de nuestros intereses; y en caso de producirse
oposición, pasando los antecedentes a los tribunales,
quedan facultados para tomar intervención como
demandantes o demandados ante los jueces que
sean competentes, pudiendo transar, someter a
árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las
demás facultades que resulten necesarias, y por el
presente declaramos desde ahora válido y bueno
cuanto dichos representantes y/o los apoderados que
cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro
beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA**
LLOREDA y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO**
SANTAMARIA y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, para
solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la
protocolización de este documento y de cualquier
poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre
nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXO GROUP LIMITED**, a
corporation organized and existing under the laws of
England and Wales.

domiciled at **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Great Britain

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA** and/or
GUSTAVO TAMAYO and/or **IGNACIO SANTAMARIA**
and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia,
with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth
Floor, our true and legal representatives in Bogotá,
with power to receive notifications and to appoint
judicial or extrajudicial agents, so as to comply with
paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO**
TAMAYO and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or
ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of
them appointed, are especially empowered to
represent us before the administrative, judicial or
police authorities of Colombia, in all proceedings
pertaining to industrial property, for which purpose we
authorize them to take before the said authorities all
the necessary steps for the said end; to file petitions,
declarations, claims, recourses and withdrawals, to
draw up specifications; to file amendments, to limit
the scope of applications, file oppositions; file
cancellations total or partially waive registrations, to
pay all installments and effect all other payments
prescribed by law; to receive proper receipts, to
comply with all other requirements and, in short, to
take all those measures which they may deem fit for
the protection of our interests; and in case of
opposition, where the proceedings be passed over to
the courts, we authorize said agents to act on our
behalf, as complainants as well as defendants, before
the competent judges, with full powers to make
arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to
collect, to appeal and, in short, with all such further
powers as may be required, and we hereby declare
from now on as valid and good all that said
representatives and/or the agents by any one of them
appointed may do for our benefit.

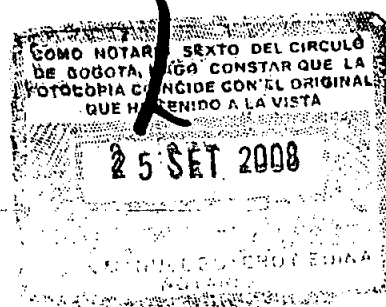
We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA**
and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO**
SANTAMARIA and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, to apply
for protocolization of this document and of any power
of attorney by any one of them conferred in our name,
before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

23 AUG 2004

Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: C07K 16/24
(22) Fecha de solicitud: 31-10-08	(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED
(30) Prioridad (31) <i>No. Prioridad</i> (32) <i>Fecha</i> (33) <i>País</i> 0610438.4 25-05-06 GB 0611046.4 05-06-06 GB	(72) Inventor(es): ELLIS, Jonathan Henry; GERMASCHEWSKI, Volker; HAMBLIN, Paul Andrew y KIRBY, Ian.
	(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25-12-08	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 23-05-07 No. de solicitud: PCT/EP2007/055029	Fecha: 06-12-07 N° publicación: WO 2007/137984 A3
(54) Título: ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS MODIFICADOS	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que tiene las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDRH1:SEC. ID. N°: 1

CDRH2:SEC. ID. N°: 2

CDRH3:SEC. ID. N°: 3

CDRL1:SEC. ID. N°: 4

CDRL2:SEC. ID. N°: 5

CDRL3:SEC. ID. N°: 6.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 31-10-08

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **GLAXO GROUP LIMITED**

(72) Inventor(es): ELLIS, Jonathan Henry; GERMASCHEWSKI, Volker; HAMBLIN, Paul Andrew y KIRBY, Ian.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) <i>No. Prioridad</i>	(32) <i>Fecha</i>	(33) <i>País</i>
	0610438.4	25-05-06	GB
	0611046.4	05-06-06	GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25-12-08

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **06-12-07**

Fecha de presentación de la solicitud: 23-05-07

N° publicación: **WO 2007/137984 A3**

No. de solicitud: **PCT/EP2007/055029**

(54) Título: **ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS MODIFICADOS**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-10-08

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **GLAXO GROUP LIMITED**

(72) Inventor(es): ELLIS, Jonathan Henry; GERMASCHEWSKI, Volker; HAMBLIN, Paul Andrew y KIRBY, Ian.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0610438.4	25-05-06	GB
	0611046.4	05-06-06	GB

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25-12-08

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 23-05-07

No. de solicitud: **PCT/EP2007/055029**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **06-12-07**

No. Publicación : **WO 2007/137984 A3**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título:

ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS MODIFICADOS

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que tiene las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDRH1:SEC. ID. N°: 1

CDRH2:SEC. ID. N°: 2

CDRH3:SEC. ID. N°: 3

CDRL1:SEC. ID. N°: 4

CDRL2:SEC. ID. N°: 5

CDRL3:SEC. ID. N°: 6.

CONTINUA AL RESPALDO ...

10

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

To: GLAXOSMITHKLINE Attn. Sayce, Alastair George Corporate International Property (CN925.1) 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE	GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 30 NOV 2007
---	---

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's reference RLE/PB61990	ATTY: <i>AKS</i> ADMIN: <i>WJ/mm</i>	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. <i>301</i> PCT/EP2007/054029	INTERNATIONAL FILING DATE 23/05/2007	
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Müge van Eijck
---	---

AA

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for International preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference RLE/PB61990	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2007/055029	International filing date (day/month/year) 23/05/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 25/05/2006
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6b/s(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

MODIFIED HUMANISED ANTI-INTERLEUKIN-18 ANTIBODIES

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2007/055029

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/055029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/24 A61P37/06 A61K39/395 G01N33/53
ADD. C07K14/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
✓ X	WO 00/56771 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB]; HO YEN SEN) 28 September 2000 (2000-09-28) sequences 1-16 pages 5,17-18,, column 20 claims 1-26	1-6, 9-13,25, 29-38
✓ X	US 2005/147610 A1 (GHAYUR TARIQ [US] ET AL) 7 July 2005 (2005-07-07) example 2.2 tables 5,6,8	11,13, 26,29-38
✓ X	WO 01/58956 A (BASF AG [DE]; GHAYUR TARIQ [US]; DIXON RICHARD W [US]; ROGUSKA MIKE [U]) 16 August 2001 (2001-08-16) examples 1-4 table 12	11,13, 26,29-38
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 November 2007

Date of mailing of the international search report

30/11/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bumb, Peter

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/055029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
✓ X	CHEN Y ET AL: "Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured fab in complex with antigen" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 293, no. 4, 5 November 1999 (1999-11-05), pages 865-881, XP004461879 ISSN: 0022-2836 tables 6,8	39,40
✓ A	----- JOHNSTONE R W ET AL: "The effect of temperature on the binding kinetics and equilibrium constants of monoclonal antibodies to cell surface antigens" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 27, no. 4, 1990, pages 327-333, XP003001219 ISSN: 0161-5890 the whole document -----	39,40

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/055029

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 33 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-38

the provision of alternative humanized anti-IL-18 antibodies

2. claims: 39-40

the provision of an alternative method for the selection of therapeutic antibodies of undefined specificity, involving the comparison of binding affinity or off-rate at two different temperatures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/055029

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0056771	A	28-09-2000	AU 764622 B2	28-08-2003
			AU 3901600 A	09-10-2000
			BR 0008688 A	08-01-2002
			CA 2368965 A1	28-09-2000
			CN 1352650 A	05-06-2002
			CZ 20013362 A3	13-03-2002
			EP 1163271 A1	19-12-2001
			HU 0200502 A2	29-06-2002
			JP 2002542769 T	17-12-2002
			NO 20014524 A	14-11-2001
			NZ 513699 A	27-02-2004
			PL 350460 A1	16-12-2002
			TR 200102733 T2	22-04-2002
			TR 200202253 T2	23-12-2002
			TR 200202254 T2	23-12-2002
			ZA 200107639 A	17-09-2002

US 2005147610	A1	07-07-2005	NONE	

WO 0158956	A	16-08-2001	AR 027404 A1	26-03-2003
			AU 3680701 A	20-08-2001
			BG 107045 A	30-05-2003
			BR 0108188 A	25-02-2003
			CA 2399148 A1	16-08-2001
			CN 1461310 A	10-12-2003
			EP 1257585 A2	20-11-2002
			HU 0300423 A2	28-06-2003
			JP 2004500086 T	08-01-2004
			MX PA02007756 A	10-09-2004
			NO 20023788 A	09-10-2002
			NZ 520392 A	29-04-2005
			PL 356836 A1	12-07-2004
			SK 12942002 A3	02-05-2003
			ZA 200206266 A	06-11-2003

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/137984 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/24 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/055029

(22) International Filing Date: 23 May 2007 (23.05.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

0610438.4 25 May 2006 (25.05.2006) GB
0611046.4 5 June 2006 (05.06.2006) GB

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ELLIS, Jonathan Henry** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **GER-MASCHEWSKI, Volker** [DE/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **HAMBLIN, Paul Andrew** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **KIRBY, Ian** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agent: **SAYCE, Alastair George**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property CN925.1, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(88) Date of publication of the international search report:
24 January 2008

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **MODIFIED HUMANISED ANTI-INTERLEUKIN-18 ANTIBODIES**

(57) Abstract: The present invention discloses humanised anti-IL-18 antibodies, methods of manufacture and methods of treatment with said antibodies. Further disclosed are screening methods using for example surface plasmon resonance to identify antibodies with therapeutic potential.

WO 2007/137984 A3

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/EP2007/055029	International filing date (day/month/year) 23.05.2007	Priority date (day/month/year) 25.05.2006	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07K16/24 A61P37/06 A61K39/395 G01N33/53 ADD. C07K14/54			
Applicant GLAXO GROUP LIMITED			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion See form PCT/ISA/210	Authorized Officer Bumb, Peter Telephone No. +31 70 340-8936 
--	---	---

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/055029

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed.
- ☒ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/055029

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 33 (with respect to industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 33 (with respect to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/055029

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>4,6-10,12, 14-28, 35, 38,40</u>
	No: Claims	<u>1-3,5,11,13,29-34,36-37,39</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>21-24</u>
	No: Claims	<u>1-20,25-40</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-32,34-40</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/055029

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/055029

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 00/56771 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB]; HO YEN SEN) 28 September 2000 (2000-09-28)
D2: US 2005/147610 A1 (GHAYUR TARIQ [US] ET AL) 7 July 2005 (2005-07-07)
D3: CHEN Y ET AL: "Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured fab in complex with antigen" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 293, no. 4, 5 November 1999 (1999-11-05), pages 865-881, XP004461879 ISSN: 0022-2836
D4: JOHNSTONE R W ET AL: "The effect of temperature on the binding kinetics and equilibrium constants of monoclonal antibodies to cell surface antigens" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 27, no. 4, 1990, pages 327-333, XP003001219 ISSN: 0161-5890

Re Item I

Basis of the report

- 1.1 As the applicant has provided one additional search fee the opinion provided below will be based on both of the non-unitary inventions identified below (see Item IV).

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 2.1 Claim 33 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item IV

Lack of unity of invention

- 3.1 The underlying application deals with immunoglobulins, specifically with (a) humanized anti-IL-18 antibodies and (b) general methods for selecting therapeutic

antibodies involving the comparison between two k_{off} -rates or two K_D values obtained at two different temperatures applicable to multiple antibodies of differing antigen-specificity. The unifying concept between these two alleged inventions is the binding of an antibody to an antigen which is copiously known in the art (see i.e. D1; page 2, lines 22-36), i.e. for anti-IL-18 antibodies.

The technical problem to be solved by the underlying application are thus:

Invention 1 (claims 1-38) the provision of alternative humanized anti-IL-18 antibodies

Invention 2 (claims 39-40) the provision of an alternative method for the selection of therapeutic antibodies of undefined specificity, involving the comparison of binding affinity or off-rate at two different temperatures.

Given the essential difference between the problems posed and the respective solutions provided, due to the fact that antibody/antigen-binding is known in the art and in since in view of the prior art no other technical feature could be distinguished as being new and common to the proposed solutions, the International Search Authority does not consider these two proposed inventions to be so linked as to form a single common inventive concept.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Invention 1 (claims 1-38)

Novelty

- 4.1 D1 discloses a method for the humanization of rat mAb 2C10, involving the grafting of present SEQ ID Nos: 1-6 into human acceptor framework regions (see D1; page 20, lines 10-15). The subject-matter of claim 1 is not novel (Article 33(2) PCT).

- 4.2 The formulation "wherein the residue at position X ... is substituted with the corresponding residue found in the donor antibody" is meaningless as long as said reference donor antibody is not defined. I.e. the humanized antibody of D1 may serve as donor antibody, in which case grafting the CDRs of D1 into the same frameworks as in D1, resulting again in the humanized antibody of D1 falls within the scope of present claim 2. The subject-matter of claim 2 is not novel (Article 33(2) PCT).

The same argumentation applies, *mutatis mutandis*, to the subject-matter of claim 3 (Article 33(2) PCT).

The formulation "wherein said light chain CDRs are derived from ..." (see claim 5) does not further define structural features of the **claimed** antibody *per se* and thus does not provide any further limiting technical feature over the subject-matter of claim 1. The subject-matter of claim 5 is not novel (Article 33(2) PCT).

D1 also discloses the use of such antibodies in the treatment of autoimmune diseases, i.e. rheumatoid arthritis (see D1; page 5, lines 23-36), and the expression thereof in mammalian expression systems (see D1; pages 17-18). The subject-matter of claims 29-33, 34, 36-37 is not novel (Article 33(2) PCT).

- 4.3 Humanized anti-IL-18 antibodies comprising CDRs as set forth in SEQ ID Nos: 1-6 and comprising the specific amino acids (phenylalanine, tyrosine, aromatic amino acids, SEQ ID NO: 37 or 38) at specific framework positions as defined in present claims 4, 6-10, 14-25 have not been reported and are thus novel (Article 33(2) PCT).
- 4.4 D2 discloses human anti-human IL-18 mAb 2.5(E)mg1 having a KD of 196 pM (which is > 90 pM) and an off-rate of 52.4×10^{-6} 1/s (which is < 0.0002 1/s). The subject-matter of claims 11 & 13 is not novel (Article 33(2) PCT).
- 4.5 The combinations of technical features as per claims 12, 26-28, 35, 38 has not been previously reported and are thus novel (Article 33(2) PCT).

Inventive Step

- 5.1 D1 is the closest prior art to the subject-matter of the claims and discloses a method for grafting CDRs according to present SEQ ID NOs: 1-6 into human acceptor framework regions (see above).
- 5.2 The subject-matter of claims 21-24 differs from D1 in the specific amino acid sequences of the variable light chain and variable heavy chain regions (SEQ ID NO: 9 + 13 (H1L2), 9 + 29 (H1L1), 17 + 13 (H2L2), 17 + 29 (H2L1), 21 + 13 (H3L2), 21 + 29 (H3L1)) and the respective constant regions. The technical effect resulting from said differences is an affinity for hIL-18 of 16.5 pM - 33.5 pM compared to 13.9 pM for rat mAb 2C10 (see page 39, Table 3a) and reduced human immunogenicity. The technical problem to be solved with respect to D1 is thus the modification of 2C10 so that it becomes less immunogenic yet maintains essentially the same affinity.

Humanization as such to reduce immunogenicity is known. However, the structural features, specifically the choice of humanized FR-regions, which maintain affinity for hIL-18 would not have been foreseen by the person skilled in the art. The subject-matter of claims 21-24 involves an inventive step (Article 33(3) PCT).

- 5.3 The affinity of a classical antibody is the direct result of the three-dimensional structure of its entire antigen-binding region, and thus relies on the structural features of VH and VL regions and three CDRs and four FR-regions per VH and VL. It follows that any claim that does not structurally define the required six CDRs and eight FR-regions is missing essential technical features of the invention.

Claims 4, 6-10, 12, 14-20, 26-28 are formulated in terms of "an antibody ... comprising/having ... [some] CDRs set forth in [selected from those in] SEQ ID NOs: ..." (see Clarity, Item VIII) and thus are limited only to those antibodies which comprise two (of three required) CDRs selected from said SEQ ID Nos. Consequently, the subject-matter of said claims is missing essential CDRs of

the invention.

Claims 4, 9, 10, 28 only define a single FR-residue of the light chain and thus are missing seven FR-regions and the majority of the eighth one. Claims 6, 12, 27 only define the CDRs taken from a donor antibody and thus are missing eight FR-regions. Claims 7, 8, 9, 10 are missing four heavy chain FR-regions. Claim 25 is missing three VH-CDRs, seven FR-regions and the majority of the eighth one. Claim 26 is not providing any structural features at all.

The subject-matter of claims 4, 6-10, 12, 14-20, 25-28 thus is not providing a complete technical solution in the sense of Article 33(3) PCT.

- 5.4 Claims 35 & 38 only provide further technical features over the known method of claim 34 (see D1, above) which are routinely practised within the field of mammalian protein expression. The subject-matter of claims 35 & 38 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

Industrial Applicability

- 6.1 For the assessment of the present claims 30-33 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Invention 2 (claims 39-40)

Novelty

- 7.1 D3 discloses the measurement of K_D and k_{off} (= off-rate = $K_d = k_d$ ($\neq K_D$)) of mAb Y0317 for VEGF(109) at 25°C and at 37°C (see D3; Tables 6 & 8), wherein

$K_D(25^\circ\text{C}) > K_D(37^\circ\text{C})$ (and thus **affinity** at 37°C is higher), wherein the authors select said mAb based on these binding characteristics and stipulate improved therapeutic efficacy, the ultimate goal of the procedure. The subject-matter of claim 39 is not novel (Article 54(1) and (2) EPC).

- 7.2 Claim 40 refers to a $k_{\text{off}}(37^\circ\text{C})$ which is **slower** than a $k_{\text{off}}(25^\circ\text{C})$. Since the unit of the constant k_{off} is sec^{-1} (the unit of frequency, 1/sec being slower than 2/sec) this is synonymous to $k_{\text{off}}(37^\circ\text{C}) < k_{\text{off}}(25^\circ\text{C})$.

A method for selecting antibodies for therapeutic use involving the measurement of a $k_{\text{off}}(30-45^\circ\text{C}) < k_{\text{off}}(20-25^\circ\text{C})$ has not been previously reported. The subject-matter of claim 40 is novel (Article 54(1) and (2) EPC).

Inventive Step & Disclosure

- 8.1 The technical problem to be solved by the subject-matter of claim 40, in its broadest sense, is the provision of a method for selecting a therapeutic antibody having i.e. $k_{\text{off}}(37^\circ\text{C})$ **smaller than** $k_{\text{off}}(25^\circ\text{C})$

The technical problem has not been solved.

Careful comparison of Tables 3a, 3b, 4a, 4b, 5 and 6 of the description leads to the conclusion that in all comparable experiments for the same antibody $k_{\text{off}}(37^\circ\text{C})$ **is greater than** $k_{\text{off}}(25^\circ\text{C})$. Indeed, this corresponds to common thermodynamic principles (see D4; whole document, specifically Fig. 2).

The proposed method does not solve the abovementioned technical problem, there are severe doubts as to the reproducibility of the proposed method, thus leading to objections under Article 33(3) PCT and Article 5 PCT.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Invention 1

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/055029

- 9.1 Claims 2, 3, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 26 refer to an unnamed donor antibody and certain structural features thereof (CDRs, single amino acids) which should be identical or different from the "corresponding" structural features of the claimed antibody. Without defining the reference donor antibody such "corresponding/different" features are meaningless and leave the reader in doubt as to the technical features referred to (Article 6 PCT).
- 9.2 Claims 3-6, 8-10, 12, 14-20, 25, 27 refer to "antibodies having CDRs set forth in SEQ ID NOs ..." wherein said formulation may be understood to mean "antibodies having more than one CDR selected from the group of the following SEQ ID NOs", thus leaving the reader in doubt as to the number of CDRs referred to (Article 6 PCT).
- 9.3 The antibody of claim 9 simultaneously comprises a phenylalanine and tyrosine at the same position 71 (Article 6 PCT).
- 9.4 References to another patent publication are not admissible in the claims (see claim 6) (Rule 6.2 PCT).
- 9.5 Claims 11 & 12 define an antibody with a KD of >90 pM (in other words: 90 pM or worse affinity) which is in contrast to the stated intention of the invention of providing effective antibodies (Article 6 PCT).
- 9.6 The formulation "has a sequence set forth in" (see i.e. claims 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) implies the selection of a subsequence from said SEQ ID Nos, which in its broadest interpretation means two amino acids, thus leaving the reader in doubt as to the structure of the FR-regions referred to (Article 6 PCT).

Furthermore, claim 17 refers to FR-regions "derived" from SEQ ID NO: 37, which implies an undefined number of unnamed modifications with respect to said SEQ ID NO, again leaving the reader in doubt as to the technical feature referred to (Article 6 PCT).

Invention 2

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/055029

10.1 As discussed under the inventive step reasoning for Invention 2 above, the subject-matter of claim 40 does not fulfill the requirements of Article 5 PCT as the proposed methods contradicts common thermodynamic principles.

10.2 The subject-matter of claims 39 & 40 is unclear (Article 6 PCT) as it does not become clear that the proposed two steps of carrying out affinity/off-rate measurements are carried out on the same antigen or at comparable conditions. The comparative value of two affinity measurements, wherein i.e. antibody-concentrations or solvents differ is very limited.

ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS
MODIFICADOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención describe anticuerpos humanizados contra IL-18, procedimientos de fabricación y procedimientos de tratamiento con dichos anticuerpos. Además, se describen procedimientos de selección usando por ejemplo resonancia de plasmón superficial para identificar anticuerpos con potencial terapéutico.

10

ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS
MODIFICADOS

1. CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere de forma general al campo de las inmunoglobulinas tales como anticuerpos y en particular un anticuerpos humanizados, de utilidad en el tratamiento y diagnóstico de afecciones mediadas por interleuquina-18 humana.

10 **2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- La interleuquina-18 humana (hIL-18) es una citoquina que se sintetiza en forma de una proteína precursora de 193 aminoácidos biológicamente inactiva (Ushio y cols., *J. Immunol.* 156:4274, 1996). La escisión de la proteína precursora, por ejemplo por caspasa-1 o caspasa-4, libera la proteína madura de 156
- 15 aminoácidos (Gu y cols., *Science* 275:206, 1997; Ghayur y cols., *Nature* 386:619, 1997), que muestra actividades biológicas que incluyen la coestimulación de la proliferación de linfocitos T, la potenciación de la citotoxicidad de los linfocitos NK, la inducción de la producción de IFN- γ por los linfocitos T y los linfocitos NK, y la potenciación de la diferenciación de los
- 20 linfocitos auxiliares T de tipo1 (Th1) (Okamura y cols., *Nature* 378:88, 1995; Ushio y cols., *J. Immunol.* 156:4274, 1996; Micallef y cols., *Eur. J. Immunol.* 26:1647, 1996; Kohno y cols., *J. Immunol.* 158:1541, 1997; Zhang y cols.,

Infect. Immunol. 65:3594, 1997; Robinson y cols., *Immunity* 7:571, 1997). Además, IL-18 es un inductor eficaz de los mediadores proinflamatorios en monocitos humanos, que incluyen IL-8, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y la prostaglandina E 2 (PGE 2) (Ushio, S. y cols., *J. Immunol.* 156:4274-4279, 5 1996; Puren, A. J. y cols., *J. Clin. Invest.* 10:711-721, 1997; Podolin y cols., *J. Immunol.* presentado, 1999).

La proteína relacionada con el receptor IL-1 (IL-1Rrp) previamente clonada (Parnet y cols., *J. Biol. Chem.* 271:3967, 1996) se identificó como una subunidad del receptor IL-18 (Kd=18 nM) (Torigoe y cols., *J. Biol. Chem.* 10 272:25737, 1997). Una segunda unidad del receptor IL-18 muestra homología con la proteína accesoria del receptor IL-1, y se ha denominado AcPL (de proteinoide accesoria "accessory protein-like" en inglés). Es necesaria la expresión tanto de IL-1 Rrp como de AcPL para la activación inducida por IL-18 de NF- κ B y JNK (Born y cols., *J. Biol. Chem.* 273:29445, 1998). Además de 15 NF- κ B y JNK, IL-18 envía señales a través de la quinasa asociada al receptor IL-1 (IRAK), p56lck (LCK), y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Micallef y cols., *Eur. J. Immunol.* 26:1647, 1996; Matsumoto y cols., *Biophys Biochem. Res. Comm.* 234:454, 1997; Tsuji- Takayama y cols., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 237:126, 1997).

20 Los linfocitos TH1, que producen citoquinas proinflamatorias tales como IFN- γ , IL-2 y TNF- β (Mosmann y cols., *J. Immunol.* 136:2348, 1986), han sido implicados en la mediación de muchas enfermedades autoinmunitarias, que incluyen la esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), diabetes de tipo 1 o insulino dependiente (DMID), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), y

soriasis (Mosmann y Sad, *Immunol. Today* 17:138, 1996). Así, sería de esperar que el antagonismo de una citocina promotora de TH1 tal como IL-18 inhibiera el desarrollo de las enfermedades. Podrían usarse mAb específicos de IL-18 como antagonista.

- 5 Se ha demostrado el papel de IL-18 en el desarrollo de enfermedades auto inmunitarias. En consecuencia, se ha demostrado que la expresión de IL-18 está significativamente aumentada en el páncreas y el bazo de los ratones diabéticos no obesos (NOD) inmediatamente antes del inicio de la enfermedad (Rothe y cols., *J. Clin. Invest.* 99:469, 1997). De forma similar, se ha
- 10 demostrado que los niveles de IL-18 están marcadamente elevados en el líquido sinovial de los pacientes de artritis reumatoide (Kawashima y cols., *Arthritis and Rheumatism* 39:598, 1996). Además, se ha demostrado que la administración de IL-18 aumenta la gravedad clínica de la encefalomiелitis alérgica experimental en ratones (EAE), una enfermedad autoinmunitaria
- 15 mediada por Th1 que es modelo para la esclerosis múltiple. Además, se ha demostrado que la neutralización del antisuero contra IL-18 de rata evita el desarrollo de EAE en ratas de Lewis hembra (Wildbaum y cols., *J. Immunol.* 161:6368, 1998). En consecuencia, IL-18 es una diana deseable para el desarrollo de un tratamiento novedoso contra la autoinmunidad.
- 20 Taniguchi y cols., *J. Immunol. Methods* 206:107, describen siete anticuerpos monoclonales (mAb) contra IL-18 de rata, que se unen a cuatro sitios antigénicos diferentes. Uno de los mAb murinos (#125-2H), y los seis mAb de rata inhiben la producción de IFN- γ inducida por IL-18 en las células KG-1, donde los mAb de rata muestran actividades neutralizadoras 10 veces menores

que la de #125-2H. Tal como se muestra mediante análisis por transferencia Western, tres de los mAb murinos, pero ninguno de los mAb de rata, son fuertemente reactivos con IL-18 humana unida a la membrana. Además, se describe un ensayo de inmunoabsorción ligado enzimas (ELISA) para detectar
5 IL-18 humana utilizando #125-2H y un mAb de rata. El límite de detección de este ELISA es 10 pg/ml.

La solicitud de patente europea EP 0 712 931 describe dos mAb de ratón contra IL-18 humana, H1 (IgG1) y H2 (IgM). Como se muestra mediante ensayo de transferencia Western, ambos mAb reaccionan con IL-18 humana
10 unida a la membrana, pero no con IL-12 humana unida a la membrana. H1 se utiliza en un protocolo de cromatografía inmunoquímica para purificar IL-18 humana, y en un ELISA para medir IL-18 humana. H2 se utiliza en un radioinmunoensayo para medir IL-18 humana.

La neutralización con anticuerpos de IL-18 puede ser potencialmente útil para
15 aliviar enfermedades autoinmunitarias y síntomas relacionados en el hombre. Por lo tanto existe una necesidad en la técnica de un antagonista de IL-18 con afinidad elevada, tal como un anticuerpo monoclonal neutralizador de interleuquina 18 humana, que reduciría la diferenciación y la proliferación de los linfocitos Th1 y así las enfermedades autoinmunitarias y síntomas
20 relacionados.

Todas las referencias que se mencionan en toda esta memoria descriptiva se incorporan de forma expresa y completa a la presente memoria por referencia.

3. SUMARIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que tiene las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDRH1:SEC. ID. N°: 1

CDRH2:SEC. ID. N°: 2

CDRH3:SEC. ID. N°: 3

CDRL1:SEC. ID. N°: 4

10 CDRL2:SEC. ID. N°: 5

CDRL3:SEC. ID. N°: 6

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que tiene las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDRH1:SEC. ID. N°: 1

CDRH2:SEC. ID. N°: 2

CDRH3:SEC. ID. N°: 3

CDRL1:SEC. ID. N°: 4

CDRL2:SEC. ID. N°: 5

CDRL3:SEC. ID. N°: 6

5 en las que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera está sustituido por el residuo correspondiente que se encuentra en el anticuerpo donador del que se derivan las CDR.

10 Para los expertos en la técnica será obvio que el término "derivado" se pretende que defina no sólo la fuente en el sentido de que sea el origen *físico* del material sino también para definir material que es estructuralmente idéntico al material pero cuyo origen no sea la fuente de referencia. Así, el residuo correspondiente "que se encuentra en la estructura del anticuerpo donador del que se derivan las CDR" no tiene que purificarse necesariamente a partir de la estructura del anticuerpo donador. De forma similar, las CDR "derivadas de un anticuerpo donador" no tienen que ser purificadas necesariamente a partir del
15 anticuerpo donador.

Las CDR y las regiones estructurales (FR) y la numeración de los aminoácidos siguen, a no ser que se indique lo contrario, la definición de Kabat tal como se describe en Kabat y cols "Sequences of immunological interest", NIH.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR que se derivan de un anticuerpo donador injertado sobre una estructura aceptora humana, anticuerpo contra interleuquina 18 que comprende CDR que tienen las secuencias que se

describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en las que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera de dicho anticuerpo contra interleuquina 18 es idéntico al residuo que se encuentra en la posición correspondiente de la estructura del anticuerpo donador.

- 5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, anticuerpo que comprende una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera.

- 10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada que tiene CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 y una cadena ligera que tiene CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6, en la que dichas CDR de la cadena ligera se derivan de un anticuerpo donador que tiene una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera del anticuerpo donador.

- 15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR de un anticuerpo donador y una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera de dicho anticuerpo humanizado, en el que el anticuerpo donador es 2C10 o una variante estructural del mismo (es decir el anticuerpo humanizado comprende las mismas CDR que 2C10
20 pero una estructura diferente, véase la patente de Estados Unidos 6.706.487).

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que tiene CDR con las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora y

(b) una cadena ligera que tiene CDR con las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera humana aceptora, en la que dicha estructura de cadena ligera humana aceptora comprende regiones estructurales derivadas de la SEC. ID. N°: 38, en la que la posición 71 de la SEC. ID. N°: 38 es una tirosina.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que tiene CDR que permiten la unión específica a IL-18 humana;

(b) una cadena ligera que comprende una estructura aceptora y que tiene CDR con las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 y que tiene un residuo tirosina en la posición 71.

Las CDR de la cadena ligera preferiblemente están localizadas en posiciones de la estructura aceptora que corresponden a las posiciones respectivas de las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 dentro de la secuencia que se describe en las SEC. ID. N°: 35. La cadena ligera y/o la cadena pesada preferiblemente no son inmunógenas en un paciente humano.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 y;

(b) una cadena ligera que comprende CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de
5 cadena ligera humana aceptora, en la que dicha estructura de cadena ligera aceptora de dicho anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 comprende regiones estructurales derivadas a partir de una variante de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que dicha variante comprende una
10 tirosina en la posición 71 y, en la que dicha variante comprende una identidad del 75% o superior con la estructura que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38. Preferiblemente dicha variante comprende una identidad del 80% o superior por ejemplo 81%, 82%, 83%, 84%, más preferiblemente 85% o superior por ejemplo 86%, 87%, 88%, 89%, incluso más preferiblemente 90% o superior por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, lo más preferiblemente 95%
15 o superior por ejemplo 96%, 97%, 98%, 99% con la estructura que se describe en la SEC. ID. N°: 38.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 derivadas de un
20 anticuerpo donador, anticuerpo donador que comprende una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera del anticuerpo donador;

(b) una estructura aceptora humana, estructura aceptora que comprende una fenilalanina en la posición 71 de la cadena ligera humana;

en la que el anticuerpo contra interleuquina 18 comprende una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- 5 (a) CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 derivadas de un anticuerpo donador, anticuerpo donador que comprende un aminoácido aromático en la posición 71 de la cadena ligera del anticuerpo donador;

- (b) una estructura aceptora humana, estructura aceptora que comprende en la posición 71 de la estructura de cadena ligera aceptora un tipo de aminoácido
10 aromático diferente del aminoácido aromático de la parte (a);

en el que el anticuerpo contra interleuquina 18 comprende una cadena ligera que tiene en la posición 71 un aminoácido aromático derivado del anticuerpo de la parte (a).

- En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado
15 contra interleuquina-18, anticuerpo que presenta una constante de equilibrio (KD) de 300 pM o inferior con respecto a la unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo Biacore™, preferiblemente usando un instrumento Biacore™ 3000 y las condiciones que se describen en 7.4.1 más adelante) a 37°C.

- 20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR tal como se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y presenta una constante de equilibrio (KD) de 300

pM o inferior con respecto a la unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (preferiblemente usando un instrumento Biacore™ 3000 y las condiciones que se describen en 7.4.1 más adelante) a 37°C.

- 5 Preferiblemente la constante de equilibrio (KD) del anticuerpo con respecto a la unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (preferiblemente usando un instrumento Biacore™ T100 y las condiciones que se describen en 7.4.2 más adelante) a 37°C es inferior a 90 pM. Más preferiblemente, la constante de equilibrio es 70 pM o inferior y
10 todavía más preferiblemente, 65 pM, 60 pM, 55 pM, o 50 pM o inferior.

- En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18, anticuerpo que presenta una constante de disociación o velocidad de disociación (k_d) de 0,0002 1/s o más con respecto a unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por
15 ejemplo Biacore™, preferiblemente usando un instrumento Biacore™ T100 y las condiciones que se describen en 7.4.2 más adelante) a 37°C.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo
20 donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que uno o más

residuo/s de la/s posición/es 27, 28, 29, 93, 39, 40, 36, 71, 89, 91 de la cadena pesada son idénticas al residuo correspondiente de la cadena pesada del anticuerpo donador;

- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en las SEC. ID. N°: 38, en la que la posición 71 y opcionalmente uno o más (por ejemplo todos) el/los residuo/s de la/s posición/es 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

(b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de

cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera de dicho anticuerpo contra interleuquina 18 es idéntico al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

- 5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora,
- 10 estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 39, 40, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;
- 15 (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que el residuo de la
- 20 posición 71 de la cadena ligera es idéntico al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 36, 39, 40, 71, 89, 91, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

(b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera es idéntico al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la
- 5 secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que los residuos de las posiciones 71, 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena ligera del anticuerpo donador.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- 10 (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los
- 15 residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93, 39, 40 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5
- 20 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que los residuos de las posiciones 71, 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena ligera del anticuerpo donador.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93, 39, 40, 36, 71, 89, 91 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

(b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que los residuos de las posiciones 71, 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena ligera del anticuerpo donador.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la relación entre la velocidad de disociación (k_d) de dicho anticuerpo de la unión a IL-18 humana a 25°C y velocidad de disociación (k_d) de dicho anticuerpo de la unión a IL-18 humana a 37°C es 1:5 o inferior, y, en el que dicho anticuerpo comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador y una estructura aceptora humana, y, en el que un residuo de la posición 71 de la

cadena ligera de la estructura aceptora humana está sustituido por el residuo correspondiente del anticuerpo donador. La velocidad de disociación se mide preferiblemente usando un instrumento BiacoreTM T100 y las condiciones que se describen en 7.4.2 más adelante.

- 5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada que se selecciona a partir del grupo constituido por: SEC. ID. N°: 9, SEC. ID. N°: 17, SEC. ID. N°: 21; y una cadena ligera que se selecciona a partir del grupo constituido por: SEC. ID. N°: 13, SEC. ID. N°: 29.

-) 10 En particular, la invención proporciona un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 9 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 13 o una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 9 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 29.

- La invención también proporciona un anticuerpo humanizado contra
15 interleuquina-18 que comprende una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 17 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 13 o una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 17 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 29.

- La invención también proporciona un anticuerpo humanizado contra
interleuquina-18 que comprende una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 21 y
20 una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 13 o una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 21 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 29.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica

que comprende un anticuerpo contra interleuquina 18 tal como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de selección de un anticuerpo (en particular un anticuerpo que inhibe la interacción entre un
5 ligando y un receptor tal como un anticuerpo contra interleuquina 18) para uso terapéutico, procedimiento que comprende;

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

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

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

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de selección de un anticuerpo (en particular un anticuerpo que inhibe la interacción entre un
20 ligando y un receptor tal como un anticuerpo contra interleuquina 18) para uso terapéutico, procedimiento que comprende;

(a) medir la velocidad de disociación (usando por ejemplo resonancia de

plasmón superficial, tal como Biacore™) del anticuerpo de un antígeno al que el anticuerpo se une específicamente, a una temperatura entre 30 y 45°C (preferiblemente 37°C);

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

(c) seleccionar dicho anticuerpo para uso terapéutico si la velocidad de disociación de (a) es menor que la velocidad de disociación de (b).

- 10 El término "contra interleuquina-18" en lo que se refiere a anticuerpos de la invención quiere decir que tales anticuerpos pueden neutralizar la actividad biológica de interleuquina-18 humana. Sin embargo no se excluye que dichos anticuerpos además puedan neutralizar la actividad biológica de interleuquina-18 de primates no humanos (por ejemplo rhesus y/o macaco).

15 **4. Anticuerpos humanizados**

- El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos conlleva los ahora bien establecidos problemas de la potencial capacidad inmunógena, especialmente tras la administración repetida del anticuerpo. Es decir el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como extraño y generar una respuesta de neutralización. Además de desarrollar anticuerpos completamente humanos (véase arriba) se han desarrollado diversas técnicas en estos años para

superar estos problemas y generalmente implican reducir la composición de las secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico intacto a la vez que se mantiene la relativa facilidad de la obtención de anticuerpos no humanos en un animal inmunizado por ejemplo ratón rata o conejo. En

5 términos generales se han utilizado dos estrategias para lograrlo. La primera son anticuerpos quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo de roedor tal como ratón) fusionado a una región constante humana, véase Morrison (1984), PNAS, 81, 6851. Debido a que el sitio de unión de antígenos de un anticuerpo está localizado en las

10 regiones variables, el anticuerpo quimérico mantiene su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y por lo tanto, es capaz de realizar funciones efectoras tal como se describe anteriormente. Los anticuerpos quiméricos se producen típicamente usando procedimientos de recombinación de ADN. El ADN que codifican los

15 anticuerpos (por ejemplo ADNc) se aísla y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo ADN que codifica las SEC. ID. N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 que se describen más arriba). Las células de

20 hibridoma sirven de fuente habitual de dicho ADN. Si se desea expresar el anticuerpo quimérico, se insertan en marco ADNc que codifican las regiones variables maduras completas de las cadenas ligera y pesada en vectores de expresión apropiados que contienen, entre otras, regiones constantes de inmunoglobulinas apropiadas, habitualmente de origen humano, junto con

25 secuencias de señalización, codones de terminación, promotores, terminadores

y otros elementos necesarios para obtener la expresión del anticuerpo. Tales vectores se transfectan después en células huésped, tales como *E.Coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulinas obteniendo la síntesis del anticuerpo. El ADN
5 puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante de las cadenas L y H humanas por las correspondientes regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo murinas), véase por ejemplo Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

La segunda estrategia implica la generación de anticuerpos humanizados en
10 los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce humanizando las regiones variables. Dos técnicas de humanización se han hecho populares. La primera es la humanización mediante injerto de CDR. Las CDR forman bucles cerca del extremo N del anticuerpo, donde forman una superficie montada sobre un andamiaje que proporcionan las regiones estructurales. La
15 especificidad de unión a antígenos del anticuerpo queda definida principalmente por la topografía y por las características químicas de la superficie de sus CDR. Estas características, a su vez, vienen determinadas por la conformación de las CDR individuales o por la disposición relativa de las CDR, y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los residuos
20 que comprenden las CDR. Es posible lograr un gran descenso de la capacidad inmunógena injertando únicamente las CDR de anticuerpos no humanos (anticuerpos "donadores") sobre una estructura adecuada ("estructura aceptora") y regiones constantes (véase Jones y cols (1986) Nature 321,522-525 y Verhoeven M y cols (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto
25 de CDR en sí, puede no lograr que se mantengan completamente las

propiedades de unión a antígenos y, con frecuencia, se encuentra que deben mantenerse algunos residuos de la estructura del anticuerpo donador (que algunas veces se denominan "contramutaciones") en la molécula humanizada si quiere recuperarse una afinidad de unión de antígenos significativa (véase

5 Queen C y cols. (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M y cols. (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, pueden elegirse en una base de datos regiones V humanas que muestren la mayor homología entre las secuencias (habitualmente del 60% o superior) con el anticuerpo donador no humano, para proporcionar la estructura (FR) humana. La selección de las FR humanas

10 puede realizarse o por consenso de anticuerpos humanos o por anticuerpos humanos individuales. Cuando es necesario se sustituyen residuos clave del anticuerpo donador en la estructura aceptora humana para conservar la conformación de las CDR. Puede utilizarse la construcción de modelos por ordenador para ayudar a identificar dichos residuos estructuralmente

15 importantes, véase el documento WO99/48523.

De forma alternativa, la humanización puede lograrse mediante un procedimiento de "contrachapado". Un análisis estadístico de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas y

20 murinas, reveló que los patrones precisos de los residuos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos y la mayoría de las posiciones superficiales individuales presentan una fuerte preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (véase Padlan E.A. y cols; (1991) Mol.Immunol.28, 489-498 y Pedersen J.T. y cols (1994) J.Mol.Biol. 235; 959-

25 973). Por lo tanto, es posible reducir la capacidad inmunógena de una Fv no

humana sustituyendo los residuos expuestos de sus regiones estructurales que difieren de los que habitualmente se encuentran en los anticuerpos humanos. Debido a que la capacidad antigénica de las proteínas puede correlacionarse con la accesibilidad a la superficie, la sustitución de los residuos superficiales puede ser suficiente para que la región variable murina sea "invisible" para el sistema inmunitario humano (véase también Mark G.E. y cols (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal antibodies*, Springer-Verlag, páginas105-134). Este procedimiento se denomina "contrachapado" debido a que sólo se altera la superficie del anticuerpo, los residuos de soporte se mantienen inalterados. Estrategias alternativas adicionales incluyen las que se describen en el documento WO04/006955 y en el procedimiento de Humaneering™ (Kalobios), que utiliza los sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos cuya secuencia es similar a la línea germinal humana (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, enero de 2007, San Diego, California). Otra estrategia reciente para la humanización, implica la selección de estructurasceptoras humanas basándose en la similitud estructural entre las regiones CDR humanas y las regiones CDR del anticuerpo murino donador, en vez de basarse en la homología entre otras regiones del anticuerpo tales como regiones estructurales. Este procedimiento se conoce también como un Superhumanisation™ (Evogenix Inc.; Hwang y cols (2005) *Methods* 36:35-42).

Así, la presente invención se refiere anticuerpos humanizados tal como se describe en la sección 3 anterior. Dichos anticuerpos humanizados preferiblemente comprenden una región constante humana de un isotipo IgG,

tal como IgG1 o IgG4.

En realizaciones alternativas, las regiones variables humanizadas tal como se describen en la sección 3 anterior pueden fusionarse con una región constante no humana ("quimera inversa") por ejemplo de primates no humanos, de rata,
5 murina o de conejo.

Por supuesto, para los expertos en la técnica será obvio que las estructuras aceptoras que se describen en las SEC. ID. N°: 37 y 38 constituyen aminoácidos de inmunoglobulinas codificados por un gen VH y Vkappa respectivamente. Por tanto, comprenden tanto las regiones estructurales como
10 las CDR del anticuerpo receptor. La sustitución de las CDR del anticuerpo receptor por las CDR del donador que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y la asociación de las secuencias resultantes con secuencias estructurales adecuadas tales como las que se describen en las SEC. ID. N°: 39 y SEC. ID. N°: 40, para producir una región variable completa de
15 inmunoglobulina tales como las que se describen en las SEC. ID. N°: 11 y SEC. ID. N°: 15 está claramente dentro de las capacidades de una persona experta.

4.1. Otras modificaciones

Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos
20 receptores de Fc (FcγR) media las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fijación de complemento, la fagocitosis y la semivida/aclaramiento del anticuerpo. Pueden realizarse diversas modificaciones a la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad efectora que se desee. Por ejemplo,

en los documentos EP 0 629 240 B1 y EP 0 307 434 B2, se detallan mutaciones específicas en la región Fc para que un anticuerpo lítico se convierta en no lítico, o se puede incorporar un grupo de unión a receptores de rescate al anticuerpo para aumentar las semivida en suero, véase el documento US 5.739.277. Actualmente existen cinco receptores Fcγ humanos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y cols, (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 demostraron que un conjunto común de residuos de IgG1 está implicado en la unión de todas las FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios diferentes que no pertenecen a este conjunto común. Un grupo de residuos de IgG1 redujo la unión a todas las FcγR cuando se cambió a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y agrupadas cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza únicamente el conjunto común de residuos de IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII interactúan con residuos diferentes además de los del conjunto común. La alteración de algunos residuos, redujo únicamente la unión a FcγRII (por ejemplo Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo Glu-293). Algunas variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no afectaron la unión al otro receptor (por ejemplo Ser-267Ala mejoró la unión a FcγRII pero no afectó a la unión FcγRIII). Otras variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII reduciendo la unión al otro receptor (por ejemplo Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y redujo la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de unión de IgG1 presentaban sustituciones combinadas de alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor FcRn neonatal está implicado tanto en el aclaramiento de los anticuerpos como en la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans R.P (1997) Immunol. Res

16. 29-57 y Ghetie y cols (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766). Los residuos de IgG1 humana que se determinó que interactúan directamente con FcRn humana incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. La presente invención por lo tanto se refiere a anticuerpos de la
5 invención que tienen uno (o más) cualesquiera de los cambios de los residuos que se detallan anteriormente para modificar las semivida/aclaramiento y/o funciones efectoras tales como ADCC y/o lisis por complemento.

Otras modificaciones incluyen variantes de glucosilación de los anticuerpos de
10 la invención. Se sabe que la glucosilación de los anticuerpos en posiciones conservadas de sus regiones constantes tiene un profundo efecto sobre las funciones de los anticuerpos, en particular sobre las funciones efectoras tales como las que se describen anteriormente, véase por ejemplo, Boyd y cols (1996), Mol.Immunol. 32, 1311-1318. Se contemplan las variantes de
15 glucosilación de los anticuerpos terapéuticos o de sus fragmentos de unión de antígenos de la presente invención a los que se añade, se sustituye, se elimina o se modifica uno o más residuos carbohidrato. La introducción de un motivo asparragina-X-serina o asparragina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de residuos carbohidrato y, por lo tanto, puede usarse para
20 manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y cols (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 se aumentó la sialiación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG mediante un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1, 4-galactosiltransferasa y/o alfa, 2,3 sialiltransferasa. Se cree que el aumento de la sialilación terminal aumenta la
25 semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, al igual que la mayoría de las



- glucoproteínas, se producen en la naturaleza en forma de un mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente obvia cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, en particular en células de mamífero. Se ha desarrollado una variedad de procedimientos para preparar glucoformas
- 5 definidas, véase Zhang y cols Science (2004), 303, 371, Sears y cols, Science, (2001) 291, 2344, Wacker y cols (2002) Science, 298 1790, Davis y cols (2002) Chem.Rev. 102, 579, Hang y cols (2001) Acc.Chem.Res 34, 727. Así, la invención se refiere a una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (habitualmente monoclonales) (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo
- 10 IgG1) tal como se describe en la presente memoria que comprenden un número definido (por ejemplo 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o uno solo) glucoforma(s) de dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígenos.
- 15 Realizaciones adicionales de la invención incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención o sus fragmentos de unión de antígenos acoplados a polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de las proteínas, así como para reducir la capacidad antigénica e
- 20 inmunógena de las proteínas. Se ha investigado el uso de la PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y cols (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95.

5. Procedimientos de producción

- Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y cols (1999), J. Immunol. Methods 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) Genet. Eng. News 20:1-55), ratones (véase Pollock y cols referencia anterior) o plantas (véase Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat.Med. 4; 601-606, Baez J y cols, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E y cols; (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590). Los anticuerpos también pueden producirse por síntesis química.. Sin embargo, los anticuerpos de la invención habitualmente se producen usando tecnología de cultivo celular recombinante, notorio para los expertos en la técnica. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para su clonación (amplificación) adicional, o su expresión en una célula hospedera.
- Un sistema de expresión de utilidad es un sistema de glutamato sintetasa (tales como los que comercializa Lonza Biologics), en particular cuando la célula hospedera es CHO o NS0 (véase más adelante). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo sondas de oligonucleótidos). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus macrófagos, transposones, minicromosomas de los que los plásmidos son una realización típica. Generalmente dichos vectores incluyen además una secuencia de señalización, origen de replicación, uno o más genes testigo, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción ligadas operablemente al polinucleótido de la cadena ligera y/o pesada para

facilitar su expresión.. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados e introducirse (por ejemplo mediante transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula hospedera de forma concurrente o secuencial o, si se desea,
5 tanto la cadena pesada como la cadena ligera deben insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.

Para los expertos en la técnica, será obvio inmediatamente que debido a la redundancia del código genético, hay disponibles polinucleótidos alternativos a
10 los descritos en la presente invención que codificarán los polipéptidos de la invención.

5.1 Secuencias de señalización

15 Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en forma de proteína de fusión con una secuencia de señalización heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La secuencia de señalización debería ser reconocida y procesada por la célula hospedera. Para las células huésped procariotas, la secuencia de señalización
20 puede ser una secuencia codificadora de fosfatasa alcalina, penicilinasa, o enterotoxina termoestable II. Para la secreción por las levaduras, las secuencias de señalización pueden ser una secuencia codificadora de invertasa, una secuencia codificadora del factor α de fosfatasa ácida, véase por ejemplo el documento WO90/13646. En los sistemas de células de mamífero,
25 están disponibles las secuencias codificadoras secretoras víricas, tales como la

señal gD del herpes simplex gD y una secuencia de señalización de inmunoglobulina nativa (tal como la cadena pesada de Ig humana). Habitualmente, la secuencia de señalización se liga en el marco de lectura al polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

5

5.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación son notorios en la técnica, siendo pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias gram negativas, el plásmido 2 μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes víricos tales como los de SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de células mamíferas. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para los lectores de expresión mamíferos integrados, a no ser que sea necesaria la propagación de vectores en *E. Coli*. Sin embargo, puede usarse ori de SV40 dado que contiene el promotor temprano.

10
15

5.3 Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo a ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxotróficas o proporcionan nutrientes no disponibles en los medios complejos o (c) combinaciones de ambas. El esquema de selección puede implicar detener el crecimiento de la célula hospedera que no contiene el vector o vectores. Las células que han sido transformadas con éxito con los genes que codifican el

20
25

64

anticuerpo terapéutico de la presente invención sobreviven debido por ejemplo a la resistencia a fármacos que confiere el marcador de selección coadministrado. Un ejemplo es el sistema de selección DHFR, en el que se generan transformantes en cepas huésped negativas para DHFR (por ejemplo
5 véase Page y Sydenham 1991 Biotechnology 9: 64-68). En este sistema, el gen DHFR se coadministra con secuencias de polinucleótidos de anticuerpos de la invención y las células positivas para DHFR se seleccionan después retirando el nucleósido. Si fuera necesario, también se emplean el inhibidor de DHFR metotrexato para seleccionar los transformantes con amplificación del
10 gen DHFR. Ligando operablemente el gen a las secuencias que codifican el anticuerpo de la invención o sus derivados funcionales, la amplificación del gen DHFR produce la amplificación concomitante de las secuencias de anticuerpos de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente interesante para esta selección mediante DHFR/metotrexato y en la técnica se han
15 establecido procedimientos para amplificar y seleccionar células huésped usando el sistema DHFR, véase Kaufman R.J. y cols J.Mol.Biol. (1982) 159, 601-621, para una revisión, véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Aug. Un ejemplo adicional, es el
20 sistema de expresión de glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un gen de selección adecuado para utilizar y levaduras es el gen trp1 ; véase Stinchcomb y cols Nature 282, 38, 1979.

5.4 Promotores

- Los promotores adecuados para expresar anticuerpos de la invención, están ligados operablemente al ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para huéspedes procariotas incluyen el promotor phoA, los
- 5 sistemas de promotores de la beta-lactamasa y la lactosa, promotores de la fosfatasa alcalina, triptófano e híbridos, tales como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en en células de levaduras incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, por ejemplo enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa,
- 10 fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores de levaduras inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa.
- 15
- Los promotores para la expresión en sistemas de células de mamífero incluyen promotores de la RNA polimerasa II, que incluyen promotores víricos tales como polioma, difteria aviar y adenovirus (por ejemplo adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el
- 20 promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de rous (RSV) y el virus SV40 temprano o tardío y los promotores no víricos tales como EF-1alfa (Mizushima y Nagata Nucleic Acids Res 1990 18(17):5322. La elección del promotor puede basarse en la competitividad adecuada con la célula hospedera que se usa para la
- 25 expresión.

5.5 Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo para la expresión en eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar o además de los que se encuentran localizados en los promotores que se describen anteriormente. Las secuencias potenciadoras adecuadas de mamífero, incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. De forma alternativa, puede usarse un elemento potenciador de un virus de células eucariotas, tal como el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma, el potenciador de baculovirus o el sitio IgG2a murino (véase el documento WO04/009823). Aunque dichos potenciadores están habitualmente localizados en el vector en un sitio aguas arriba del promotor, también pueden estar localizados en cualquier otro lugar, por ejemplo dentro de la región no traducida o aguas abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posición del potenciador puede basarse en la competitividad adecuada con la célula hospedera que usa para la expresión.

5.6 Poliadenilación/Terminación

En los sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación están ligadas operablemente al polinucleótido que codifica el anticuerpo de esta invención. Dichas señales se encuentran típicamente en posición 3' del marco de lectura abierto. En los sistemas mamíferos, señales de ejemplo no limitantes incluyen las que se derivan de las hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa

67

y genes víricos (por ejemplo SV40) o repeticiones terminales largas de retrovirus. En los sistemas de levaduras, ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las de los genes de fosfoglicerato quinasa (PGK) y de alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En los sistemas procariotas, las
5 señales de poliadenilación habitualmente no son necesarias y en vez de eso, es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación Puede basarse en la competitividad adecuada con la célula hospedera que se usa para la expresión.

10 **5.7 Otros procedimientos/elementos para rendimientos mejorados**

Además de lo anterior, otras estrategias que pueden emplearse para potenciar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de la cromatina, modificación de intrones y de codones específicos de la célula hospedera. El
15 uso de los codones del anticuerpo de esta invención puede modificarse para acomodar un sesgo de codones de la célula hospedera de forma que aumente el rendimiento del transcrito y/o del producto (por ejemplo Hoekema A y cols Mol Cell Biol 1987 7(8):2914-24). La elección de los codones puede basarse en la competitividad adecuada con la célula hospedera que se usa para la
20 expresión.

5.8 Células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o los vectores de expresión
25 que codifican anticuerpos de la invención son células procariotas, de levaduras

- o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacteria por ejemplo enterobacteriaceae tales como *Escherichia* por ejemplo *E.Coli* (por ejemplo ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* *Proteus*, *Salmonella* por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*
- 5 por ejemplo *Serratia marcescans* y *Shigella* así como Bacilos tales como *B.subtilis* y *B.licheniformis* (véase el documento DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P.aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped de levaduras, se contemplan también *Saccharomyces cerevisiae*, *schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo ATCC 16,045;
- 10 12,424; 24178; 56,500), *yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, véase también Peng y cols J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillin*, *Tolypocladium* y huéspedes *Aspergillus* tales como *A.nidulans* y *A.niger*.
- 15 Aunque la invención contempla específicamente las células huésped de lavadura y procariotas, sin embargo habitualmente, las células huésped de la presente invención son células de vertebrados. Las células huésped de vertebrados adecuadas incluyen células de mamíferos tales como COS-1 (ATCC N.º CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), la línea renal embrionaria
- 20 humana 293, PerC6 (Crucell), células renales de hámster neonato (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO.CRL 1573), células de ovario de hámster chino (por ejemplo CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, la línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub y cols, (1986) referencia anterior), en particular las líneas celulares de CHO adaptadas
- 25 para cultivo en suspensión, células sertoli de ratón, células renales de mono,

células renales de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células renales caninas (ATCC CCL 34), células pulmonares humanas (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de mieloma o linfoma por ejemplo NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

5

Así, en una realización de la invención, se proporciona una célula hospedera transformada de forma estable, que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico tal como se describe en la presente memoria. Habitualmente, dichas células huésped comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Dichas células huésped también pueden manipularse por ingeniería genética adicionalmente o adaptarse para modificar la calidad, función y/o rendimiento del anticuerpo de esta invención. Ejemplos no limitantes incluyen la expresión de enzimas específicas de modificación (por ejemplo glucosilación) y chaperonas de plegamiento de proteínas.

5.9 Procedimientos de cultivo celular

20

Las células huésped transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Las células huésped pueden cultivarse en frascos en agitación centrífuga, frascos en agitación, frascos de cultivo o sistemas de fibra hueca, pero para la producción a gran

escala es preferible el uso de reactores con tanques agitados o reactores con bolsas (por ejemplo Wave Biotech, Somerset, New Jersey EE. UU.) en particular para los cultivos en suspensión. Habitualmente, los tanques en agitación se adaptan para poder ser aireados usando por ejemplo tubos burbugeadores, baffles o impulsores de baja cizalla. Para las columnas de burbujas en los reactores de extracción por aire, puede utilizarse la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Aunque las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero, se prefiere que el medio esté suplementado con un agente de protección celular tal como pluronic F-68 para ayudar a evitar daños celulares producidos por el proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula hospedera, pueden usarse microportadores como sustratos de crecimiento para las líneas celulares dependientes de anclaje por las células pueden adaptarse a un cultivo en suspensión (que es lo habitual). El cultivo de las células huésped, en particular de las células huésped de vertebrados puede utilizar una variedad de modos de operación tales como procesamiento en lotes, alimentación en lotes o lotes repetidos (véase Drapeau y cols (1994) cytotechnology 15: 103-109), proceso en lotes prolongados o cultivo con perfusión. Aunque las células huésped transformadas por vía recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero, y dichos medios comprenden suero bovino fetal (FCS), se prefiere que dichas células huésped se cultiven el medio sintético sin suero, tal como se describe en Keen y cols (1995) Cytotechnology 17:153-163, o en medios disponibles comercialmente, tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EE. UU.), suplementados, cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina

- recombinante. El cultivo sin suero de células huésped puede necesitar que esas células se adapten al crecimiento en condiciones sin suero. Una estrategia de adaptación es cultivar las células huésped en medio que contiene suero y repetidamente intercambiar el 80% de medios de cultivo por medio sin suero, de forma que las células huésped aprendan a adaptarse a condiciones de falta de suero (véase por ejemplo Scharfenberg K y cols (1995) en *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. y cols eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers).
- 10 Los anticuerpos de la invención que se segregan al medio pueden recuperarse del medio y purificarse usando una variedad de técnicas que proporcionen un grado de purificación adecuado para el uso que se pretenda. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos habitualmente requiere de una pureza de al menos el 95%,
- 15 determinada mediante SDS-PAGE reductora, más habitualmente una pureza del 98% o del 99%, comparada con el medio que comprende los anticuerpos terapéuticos. En primer lugar, habitualmente se eliminan los desechos celulares en medio de cultivo usando centrifugación seguida de una etapa de aclaramiento del sobrenadante, usando por ejemplo microfiltración,
- 20 ultrafiltración y/o filtración profunda. De forma alternativa, el anticuerpo puede recogerse mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración profunda sin la centrifugación anterior. Hay disponible una variedad de otras técnicas tales como técnicas de diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxiapatita (HA), cromatografía de afinidad (que opcionalmente
- 25 utiliza un sistema de marcado por afinidad tal como polihistidina) y/o

cromatografía por interacción hidrófoba (HIC, véase el documentoUS 5. 429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, siguiendo diversas etapas de aclaramiento, se capturan usando cromatografía de afinidad con Proteína A o G, seguida de etapas cromatográficas adicionales tales como

5 cromatografía por intercambio iónico y/o HA, cromatografía de intercambio anionico o catiónico, cromatografía por exclusión de tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Habitualmente, también se emplean diversas etapas para la eliminación de virus (por ejemplo nanofiltración usando por ejemplo un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación

10 purificada (habitualmente monoclonal) que comprende al menos 10 mg/ml o más por ejemplo 100 mg/ml o más del anticuerpo de la invención y por lo tanto forma una realización de la invención. La concentración de 100 mg/ml o superior regenerarse mediante ultracentrifugación. Habitualmente dichas preparaciones están sustancialmente libres de formas agregadas de

15 anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos se localizan intracelularmente o en el periplasma. Las proteínas periplasmáticas insolubles pueden extraerse y

20 plegarse formando proteínas activas de acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, véase Sanchez y cols (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 y Cupit PM y cols (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

6. Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones de anticuerpos de la invención purificadas (en particular las preparaciones monoclonales) tal como se describen más arriba, pueden

5 incorporarse en composiciones farmacéuticas para usar en el tratamiento de enfermedades Y trastornos humanos tales como los que se indican anteriormente. Habitualmente dichas composiciones pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir inerte) tal como se conoce y requiere la práctica farmacéutica aceptable, véase por ejemplo

10 Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª ed, (1980), Mack Publishing Co. Ejemplos de tales vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponadas con tapones adecuados en el intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas inyectables (por ejemplo intravenosas, intraperitoneales, intradérmicas,

15 subcutáneas, intramusculares o intraportales) o de infusión continua, de forma adecuada, están libres de materia particulada visible y pueden comprender entre 0,1 ng y 100 mg de anticuerpo, habitualmente entre 5 mg y 25 mg de anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas son notorios para los expertos en la técnica. En una realización,

20 las composiciones farmacéuticas comprenden entre 0,1 ng y 100 mg de los anticuerpos terapéuticos de la invención en forma monodosis, opcionalmente junto con las instrucciones de uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse para su reconstitución antes de la administración de acuerdo con procedimientos notorios u obvios para los expertos en la

25 técnica. Cuando las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de

la invención con un isotipo IgG1, puede añadirse un quelante de cobre tal como citrato (por ejemplo citrato sódico) o EDTA o histidina a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por cobre de los anticuerpos de este isotipo, véase EP 0 612 251.

5

Las dosis eficaces y las posologías de tratamiento para la administración del anticuerpo de la invención generalmente se determinan por vía empírica y dependen de factores tales como la edad, peso y estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar. Dichos factores están dentro el ámbito del
10 médico a cargo. Las directrices para seleccionar las dosis apropiadas pueden encontrarse por ejemplo en Smith y cols (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, Nueva York pero generalmente estarán entre 1 mg y 1000 mg. En una realización, la posología para tratar a un paciente humano que padece AR es de 100 mg o en ese entorno (es decir entre 50 mg y 200
15 mg) de anticuerpo de la invención (o sus fragmentos de unión de antígenos) administrados por vía subcutánea una vez a la semana o cada dos semanas. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse de manera profiláctica.

20 Dependiendo de la enfermedad o trastorno tratar, las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención pueden usarse de forma simultánea, separada o secuencial con una cantidad eficaz de otro medicamento tal como un agente antiinflamatorio por ejemplo un AINE, metotrexato, bucilamina, tiomalato sódico
25 con uno o más de un tratamiento contra TNF alfa tal como Enbrel™

(etanercept), Remicade™ (infliximab), Humira™ (adalimumab) y/o CDP870. Los anticuerpos de la invención pueden usarse combinados con una cantidad eficaz de un anticuerpo contra el receptor de TNF-alfa, véase Davis MW y cols (2000) Ann Rheum Dis 59 (Supl 1): 41-43. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención utilizarse combinados con una cantidad eficaz de un agente dirigido contra IL-1/IL-1R (por ejemplo Kineret™), CTLA4-Ig, IL-6 (véase Choy y cols, (2002) Ann.Rheum.Dis 61(suppl 1): 54), IL-8, IL-15, VEGF, IL-17, IL-18 (véase Tailor y cols (2001) Curr.Opin.Immunol.13: 611-616), anti-ICAM y/o anticuerpos contra CD4, agentes dirigidos contra un miembro de la familia MMP por ejemplo MMP-1, 2,3 y/o 13. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse combinados con un agente que restringe las células que se sabe que están implicadas en el proceso inflamatorio, por ejemplo linfocitos B positivos para CD20 usando por ejemplo Mabthera™ (Rituximab). Otros tratamientos combinados con anticuerpos de la invención incluyen jerarquías contrarias a la angiogénesis tales como antagonistas de la integrina $\alpha\text{V}\beta_3$, Kringles 1-5 (véase Sumariwalla P y cols (2003), Arthritis Res Ther 5:R32-R39.), Flt-1 soluble (véase Miotla y cols, (2000) Lab.Invest. 80:1195-1205), un agente contra COX-2 o un agente contra OSM tal como un anticuerpo contra OSM, véase el documento WO2005/095457, cuyo contenido completo se incorpora específicamente a la presente memoria por referencia y al que se refiere específicamente al lector. De forma conveniente, la presente invención contempla una composición farmacéutica que comprende un kit de partes del anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígenos del mismo junto con esos otros medicamentos opcionalmente junto con instrucciones de uso. Estas combinaciones pueden ser particularmente útiles

en el tratamiento de enfermedades/trastornos artríticos, tales como artritis reumatoide.

7. Usos clínicos

5

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en tratamientos terapéuticos de enfermedades mediadas por IL-18 tales como enfermedades autoinmunitarias. Se hace mención particular a la esclerosis múltiple, enfermedades artríticas, tales como artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y soriasis. Así, la invención comprende además un procedimiento de tratamiento de un paciente humano que padece una enfermedad que responde a la neutralización de hIL-18 (tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, EII, soriasis), procedimiento que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención, en particular un anticuerpo que tiene una cadena pesada con una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 9 y una cadena ligera que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 13.

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

25

TABLA A

Descripción de proteínas o polinucleótidos (PN)	Identificador de la secuencia (SEC. ID. N° :)
CDRH1	1
CDRH2	2
CDRH3	3
CDRL1	4
CDRL2	5
CDRL3	6
IL-18 humana	7
PN de IL-18 humana	8
Cadena pesada H1 (región variable + constante)	9
Cadena pesada H1 (PN)	10
Región variable de H1	11
Región variable de H1 (PN)	12
Cadena ligera L2 (región variable + constante)	13
Cadena ligera L2 (PN)	14
Región variable de L2	15
Región variable de L2 (PN)	16
Cadena pesada H2 (variable + constante)	17
Cadena pesada H2 (PN)	18

Región variable de H2	19
Región variable de H2 (PN)	20
Cadena pesada H3 (variable + constante)	21
Cadena pesada H3 (PN)	22
Región variable de H3	23
Región variable de H3 (PN)	24
Cadena ligera L1 (región variable y constante)	25
Cadena ligera L1 (PN)	26
Región variable de L1	27
Región variable de L1 (PN)	28
Cadena ligera L3 (región variable + constante)	29
Cadena ligera L3 (PN)	30
Región variable de L3	31
Región variable de L3 (PN)	32
Quimera de 2c10 de rata-IgG1 humana	33
Quimera de 2c10 de rata-IgG1 humana (PN)	34
Quimera de 2c10 de rata-CKappa humana	35
Quimera de 2c10 de rata-CKappa	36

humana (PN)	
Estructura de la cadena pesada aceptora	37
Estructura de la cadena ligera aceptora	38
Secuencia de aminoácidos de JH6 añadida a la SEC. ID. Nº: 37	39
Secuencia de aminoácidos de Jkappa 2 añadida a la SEC. ID. Nº: 38	40

7. Ejemplos

Los siguientes ilustran los diversos aspectos de esta invención. Todos los
5 procedimientos generales de clonación, ligado y otras tecnologías de ingeniería
genética se realizan de la forma general que se enseña en Maniatis y cols,
Molecular cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, o
Sambrook y cols Molecular Cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor
Laboratory. Los sistemas vectoriales y los procedimientos de biología
10 molecular adicionales que se usan en la presente memoria se describen en el
documento WO2005/095457, cuyo contenido completo se incorpora a la
presente memoria por referencia y al que se refiere específicamente al lector.

7.1 Clonación de regiones variables de hibridomas

15 El anticuerpo progenitor de rata 2C10 se describe en la patente de Estados
Unidos 6.706.487. Se refiere al lector específicamente a este documento.. Se

diseñó un anticuerpo quimérico 2C10c basándose en las regiones V de rata que se describen anteriormente unidas a regiones de IgG1 o kappa C humanas. Se introdujo una secuencia de señalización de inmunoglobulinas genérica y un codon de inicio de la traducción ATG para las construcciones de cadenas pesadas y ligeras. Se diseñaron sitios de restricción para endonucleasas Hind 5 III y BsiWI para enmarcar el dominio VL y permitir la clonación en vectores de expresión mamíferos que contenían la región Ckappa humana (SEC. ID. N°: 36). Se diseñaron sitios de restricción para endonucleasas Hind III y SpeI para enmarcar el dominio VH y permitir la clonación en vectores de expresión 10 mamíferos que contenían la región γ 1 C humana (SEC. ID. N°: 34). Esto produjo un cambio de dos aminoácidos para la región 2C10 Vh en la estructura 4 (Kabat residuos 107 y 108) en la secuencia publicada tal como se muestra en la SEC.ID. N°: 33.

Se utilizaron oligonucleótidos superpuestos para construir la secuencia 15 codificante completa mediante PCR y clonación en los sectores de expresión que se describen anteriormente. Después de la verificación de las secuencias, el anticuerpo quimérico se expresó en células CHO. El anticuerpo producido se purificó a partir de los sobrenadantes el cultivo celular mediante cromatografía por afinidad en sefarosa con rProtein A. Los anticuerpos quiméricos de 2C10 20 se evaluaron en ensayos de unión *in vitro* para demostrar que la potencia era comparable al 2C10 progenitor de rata. Esto se logró determinando los valores de CE50 para la unión a IL-18 humano o de mono rhesus en ELISA (Figuras 16 y 17) o mediante la inhibición de la liberación de IFN- γ en un bioensayo con KG-1, véase la Figura 15.

7.2 Humanización

7.2.1 Estrategia de humanización de la cadena ligera

Para la secuencia de la cadena ligera variable de 2C10 de rata, se seleccionó una estructura aceptora de línea germinal humana (F_IGKV1D-12-1, SEC. ID. N°: 38) que tenía una identidad del 64% (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena ligera variable 2C10 de rata. La región V de la línea germinal se combinó por ordenador con una FR4 adecuada, en este caso el minigen kappa 2 de la región J (Kabat Vol.II) basándose en la similitud de las secuencias (SEC. ID. N°: 40). Se generaron tres variantes humanizadas basándose en la comparación entre las secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción L1 era un injerto directo de CDR de rata (usando la definición de Kabat) en la estructura aceptora humana seleccionada anteriormente. La construcción L2 estaba basada en L1 con una contramutación adicional en el residuo 71. La construcción L3 estaba basada en L2 con 4 contramutaciones adicionales en los residuos 45, 83, 84 y 85. Véase la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de las variantes de VL humanizadas generadas

<u>Construcción</u>	<u>Estructura aceptora/pl antilla Estructura</u>	<u>Contramutaciones en el aa n.º (Kabat)</u>	<u>Número total de contramutaciones</u>	<u>Estructura aceptora humana</u>	<u>Secuencia de rata original</u>

<u>L1</u>	F-IGV1D-12- 1/J2:SEC. ID. Nº: 38	-----	Ninguna	-----	-----
<u>L2</u>	L1	71	1	F	Y
<u>L3</u>	L2	45 83 84 85	5	K F A T	Q E G D

7.2.2 Estrategia de humanización de la cadena pesada

Para la secuencia de la cadena pesada variable de 2C10 de rata, se seleccionó una estructura aceptora de línea germinal humana (Fp_IGHV1-f_2, SEC. ID. Nº: 37) que tenía una identidad del 59% (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena pesada variable 2C10 de rata. La región V de la línea germinal se combinó por ordenador con una FR4 adecuada, en este caso el minigen JH6 de la región J (Kabat Vol.II) basándose en la similitud de las secuencias (SEC. ID. Nº: 39). Se diseñaron tres variantes de cadenas pesadas variables humanizadas basándose en esta estructura. H1 es un injerto de las CDR de rata (usando la definición de Kabat con 4 contramutaciones adicionales en los residuos 27, 28, 29 y 93. Esto permitió una secuencia de aminoácidos muy inusual justo aguas arriba de CDR1 del anticuerpo progenitor (es decir

donador) que puede constituir partes de la CDR (tal como lo definió Chothia).
H2 estaba basada en H1 con dos contramutaciones adicionales en los residuos 39 y 40. A su vez, H3 estaba basada en H2 con otras 4 contramutaciones adicionales en los residuos 36, 71, 89 y 91. Véase la Tabla 2.

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

Construcción	Estructuras aceptora/pl antilla	Contramutaciones en el aa n.º (Kabat)	Número total de contramutaciones	Estructura aceptora humana	Secuencia de rata original
H1	Fp_IGHV1-f_2 (SEC. ID. Nº: 37)	27 28 29 93	4	Y T L A	E I S T
H2	H1	39 40	6	Q A	R R
H3	H2	36 71 89	10	W E V	F A T

		91		Y	F
--	--	----	--	---	---

7.3 Humanización de 2C10C

Se sintetizaron regiones V humanizadas *de novo* mediante la construcción de oligonucleótidos superpuestos y amplificación por PCR. Los cebadores incluían
5 sitios de restricción para su clonación en vectores de expresión mamíferos y secuencias de señalización de inmunoglobulinas humanas para la secreción. Las regiones humanizadas se clonaron en vectores de expresión mamíferos como H1, H2 y H3 usando HindIII y SpeI en vectores de expresión mamíferos que contenían la región constante gamma 1 humana y como L1, L2 y L3
10 usando HindIII y BsiWI en vectores de expresión y mamíferos que contenían la región constante kappa humana. Esto generó variantes de la cadena pesada humanizada del isotipo IgG1 humano y variantes de la cadena ligera humanizada del isotipo kappa.

7.3.1 Expresión de combinaciones de anticuerpos con cadenas pesadas y
15 **ligeras humanizadas**

Se transfectaron temporalmente células CHOK1 por cuadruplicado. Los sobrenadantes se ensayaron para determinar la concentración de anticuerpos y después se usaron en ensayos de unión *in vitro* comparando con una quimera 2C10 de rata y ser humano..
20 La expresión transitoria a mayor escala de las nueve variantes se realizó mezclando, para cada matraz 51,4 µg de plásmido con cadena ligera y 8,6 µg

85

de plásmido con cadena pesada con 240 µg de lípido de transfección (este lípido se describe en el documento WO2006/053783, ejemplo 13, cuyo contenido completo se incorpora a la presente memoria por referencia) en 8 ml de medio (OptiMEM/ glutamax/ FBS al 5%) y aplicando esta mezcla a dos
5 matraces T175 de células CHOK1 cultivadas casi a confluencia durante 72 horas en condiciones típicas de cultivo tisular. Los anticuerpos se expresaron también en un sistema de células CHO en una cantidad de mg usando matraces agitados y se purificaron utilizando FPLC y Proteína A.

7.4 Ensayos de unión in vitro

10

7.4.1 Análisis por Biacore

Se realizó un análisis cinético Biacore™ de los anticuerpos humanizados 2C10 en un aparato Biacore™ 3000 usando captura de anticuerpos con Proteína A en tampón HBS-EP (Biacore™). Resumiendo, la Proteína A se inmovilizó sobre
15 un chip CM5 mediante acoplamiento de amina primaria, usando el protocolo recomendado por el fabricante, a densidades de aproximadamente 2000-4000 unidades de resonancia (RU). El anticuerpo humanizado después se pasó sobre la superficie de la Proteína A y se capturó a niveles de aproximadamente 200-500 RU, después de un periodo de estabilización, se pasó IL-18 (humana
20 o de Rhesus) sobre la superficie del anticuerpo capturado a concentraciones definidas y se obtuvieron los sensogramas de unión. La regeneración, usando condiciones de elución ácidas, logró la separación total del anticuerpo de la superficie de la Proteína A y no redujo significativamente la capacidad de unión de la superficie. Todas las curvas se referenciaron por duplicado a una

86

inyección de tampón en lugar de IL-18 y los datos se ajustaron en un modelo de unión 1:1 usando los parámetros de ajuste global del programa BiaEval 4.1. Los experimentos de clasificación de la velocidad de disociación se diseñaron usando el mismo procedimiento de captura con Proteína A, sin embargo sólo
5 se utilizó una única concentración de IL-18 (10 nM). Aunque los datos se ajustaron usando el mismo modelo de unión que en el análisis cinético, dado que únicamente se utilizó una concentración del analito en la velocidad de disociación, este valor es útil para clasificar más que para proporcionar una medición cinética exacta y se utilizó como método para seleccionar qué
10 anticuerpos se investigarían adicionalmente.

Los resultados iniciales a 25°C indicaron que todas las construcciones presentaban afinidades de unión a IL-18 humana similares al anticuerpo progenitor 2C10 de rata. Sin embargo, cuando se realizó un experimento de clasificación de la velocidad de disociación a 37°C, las construcciones con L1
15 dieron resultados deficientes comparados con los de las construcciones L2 y L3 pudiendo observarse un aumento en las velocidades de disociación (Tablas 3a y 3b).

Tabla 3a: Parámetros cinéticos para el análisis por Biacore de anticuerpos contra IL-18 humanos, ensayados a 25°C.

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

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

Datos de los resultados de dos experimentos, (desviación típica),

Tabla 3b: Clasificación de la velocidad de disociación en el análisis por Biacore de la unión de IL-18 humana a anticuerpos humanizados contra IL-18 capturados con Proteína A, ensayados a 37°C

Anticuerpo	Kd
2C10c	7,01e-5

BB

H1L1	1,62E-4
H1L2	4,81e-5
H1L3	5,54e-5
H2L1	9,93e-5
H2L2	4,15E-5
H2L3	4,62E-5
H3L1	1,3E-4
H3L2	8,22e-5
H3L3	7,01e-5

Los datos son el resultado de un experimento.

Además de los resultados deficientes a 37°C, las construcciones con L1 también fueron las peores en cuanto a la afinidad de unión a IL-18 de Rhesus (Tabla 4a) a 25°C. Basándose en estas observaciones, los anticuerpos seleccionados se investigaron en mayor detalle para determinar la unión a IL-18 humana y de Rhesus a 37°C. Los datos que se muestran en la Tabla 4b para IL-18 humana son la media (y la desviación típica) de seis determinaciones diferentes. Los datos para la IL-18 de Rhesus muestran la media y la desviación típica de los experimentos para H1L2 y H1L3, mientras que los datos para H3L2 y H3L3 son de un único experimento. Las desviaciones típicas comparativamente elevadas de estos datos probablemente son debidas a que este experimento se realizó a 37°C.

El hecho de que las construcciones con L1 dieran resultados relativamente deficientes es sorprendente considerando que la diferencia entre las construcciones con L1 y L2 es la sustitución de una contramutación de una fenilalanina por una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera. Tanto la
5 tirosina como la fenilalanina, son por supuesto aminoácidos aromáticos, así que no se esperaba el hecho de que un cambio sutil en la estructura provocara unos resultados tan marcados (en términos de afinidad de unión) que se observaron en el sistema Biacore™ a 37°C (pero no a 25°C).

10 **Tabla 4a: Parámetros cinéticos del análisis por Biacore de la unión de IL-18 de Rhesus a construcciones de anticuerpos humanizados ensayadas a 25°C.**

Anticuerpo	<i>ka</i>	<i>Kd</i>	KD (pM)
2C10c	1,2E6	6,6e-5	54,7
H1L1	4,3E5	1,6E-4	380
H1L2	4,3E5	4,7e-5	108
H1L3	5,8E5	6,4e-5	109
H2L1	2,9E5	1,8E-4	627
H2L2	5,3E5	5,5e-5	104

H2L3	4,7E5	8,8-5	189
H3L1	9,1E5	1,4E-4	149
H3L2	1,1E6	6,6e-5	59,6
H3L3	1,0E6	7,0e-5	69,1

Los datos son el resultado de un experimento

Tabla 4b: Parámetros cinéticos del análisis por Biacore de la unión de IL-18 humana y de Rhesus a construcciones de anticuerpos humanizados seleccionados ensayadas a 37°C,

Anticuerpo/IL-18	<i>ka</i>	<i>Kd</i>	KD (pM)
H1L2			
IL-18 humana	7,75e5 (2,9e4)	1,38e-4 (1,7e-5)	197 (66,3)
IL-18 de Rhesus	1,01e6 (9,2e5)	1,40e-4 (2,1e-5)	139 (8,5)
H1L3			
IL-18 humana	7,12e5 (2,5e4)	1,18e-4 (1,9e-5)	188 (81)
IL-18 de	1,08e6 (2,2e5)	1,86e-4 (6,1e-5)	170 (21,9)

Rhesus			
H3L2			
IL-18 humana	1,52e6 (4,9e5)	1,45e-4 (2,2e-5)	105 (39,6)
IL-18 de Rhesus	1,85e6	1,19e-4	64,3
H3L3			
IL-18 humana	1,49e6 (4,5e5)	1,52e-4 (1,7e-5)	110 (36,1)
IL-18 de Rhesus	1,79e6	1,35e-4	75,6

Las variantes H1L1, H1L2 y H1L3 se seleccionaron análisis ulterior en la sección 7.4.2 más adelante.

7.4.2 Datos del análisis por Biacore T100

- 5
- La caracterización de ciertos anticuerpos variantes Se llevó a cabo mediante el aparato T100 Biacore™. Este aparato presenta ventajas con respecto al Biacore™ 3000, en lo que se refiere a sensibilidad, control de temperatura y estabilidad de base a temperaturas superiores debido al uso de un desgasificador en línea que minimiza los efectos del tampón a temperaturas superiores. También ofrece programas mejorados tales como análisis de datos automático.
- 10

La metodología fue básicamente la misma que para el procedimiento que se usa en la sección 7.4.1 anterior; la Proteína A se movilizó en un chip CM5 a densidades de entre 2000-6000 RU mediante acoplamiento de amina primaria. Los ciclos se realizaron en HBS-EP (Biacore™). Los anticuerpos contra IL-18 se capturaron a densidades de entre 100-500 RU, se pasó IL-18 humana sobre esta superficie capturada a concentraciones entre 16-0,0625 nM, con una concentración de 0 nM (es decir una inyección sólo de tampón de anticuerpo capturado) como doble referencia. La regeneración tras cada inyección de IL-18 se realizó mediante elución con ácido suave usando dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 1,5. Esta etapa de regeneración eliminó el anticuerpo capturado de la superficie de la Proteína A (y por lo tanto toda la IL-18 unida a ella). La regeneración no alteró significativamente la capacidad de la superficie de la proteína de unirse a lotes posteriores de anticuerpo, permitiendo que se produjera otro evento de captura. Las curvas de unión obtenidas se analizaron usando al programa de análisis inherente al aparato T100 usando el modelo de unión 1:1. Los ciclos se realizaron a las temperaturas que se indica.

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

El experimento se realizó usando el procedimiento anterior a diversas temperaturas. La Figura 1 muestra el efecto de la temperatura sobre la velocidad de asociación (k_a), mientras que la Figura 2 muestra el efecto sobre la velocidad de disociación (k_d) y la Figura 3 el efecto sobre la constante de equilibrio (K_D). La Tabla 5 detalla los valores cinéticos que se usaron para crear estas figuras.

Tabla 5: Parámetros cinéticos aparte del experimento de variación de la temperatura

Temp °C	Ab	Ka	Kd	KD (pM)
15	H1L1	1,49e6	2,98e-5	20,1
20	H1L1	2,02e6	4,77e-5	23,7
25	H1L1	2,52e6	7,82e-5	31,1
32	H1L1	3,48e6	1,64e-4	47,2
37	H1L1	6,30e6	3,36e-4	53,3

5 Los datos son de un único experimento.

Los datos muestran que las velocidades de asociación de los dos anticuerpos analizados son similares en el intervalo de temperatura analizado,y H1L2 generalmente tiene una velocidad de asociación más rápida hasta el valor final a 37°C cuando H1L2 tiene una velocidad de asociación más rápida. sin embargo, se observa una diferencia mayor cuando se analizan las velocidades de disociación, los dos anticuerpos tienen velocidades de disociación similares a 15°C, 20°C, 25°C, Pero comienzan a divergir a 32°C y 37°C, donde la velocidad de disociación más rápida se observa con H1L1. Estos cambios se

reflejan en la constante de equilibrio global (que está en función de k_d/k_a), e indican que la diferencia entre H1L1 y H1L2 está principalmente en la estabilidad del complejo anticuerpo/IL-18 tal como se define mediante la velocidad de disociación (k_d).

5

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

Los experimentos se realizaron tal como se describen anteriormente. La Tabla 6 detalla los parámetros cinéticos obtenidos. Los datos muestran que H1L2 es un anticuerpo mejor que H1L1 en lo que se refieren a la unión definida
10 mediante la constante de equilibrio K_D tanto a 25°C como a 37°C, pero los parámetros cinéticos muestran que, a 25°C, H1L2 tiene una mejor velocidad de asociación (k_a) que H1L1. A 37°C la posición se invierte, lo que indica que la unión superior que se observa a 37°C para H1L2 se debe más a la velocidad de disociación (k_d), lo que indica que la mutación que diferencia a L2 de L1
15 confiere una mayor estabilidad del complejo IL-18-anticuerpo a temperaturas superiores.

Tabla 6: Cinética de la unión de H1L1, H1L2, H1L3 y 2C10 quimérico a IL-18 humana a 25 °C y 37°C

IL18 humana a 25 °C				IL18 humana a 37 °C			
Ab	Ka	Kd	KD (pM)	Ab	Ka	Kd	KD (pM)
H1L1	2,49e6	7,94e-5	33,1	H1L1	5,64e6	4,58e-4	94,3
H1L2	2,88e6	4,32e-5	16,3	H1L2	4,86e6	1,98e-4	46,0
H1L3	2,36e6	4,53e-5	22,0	H1L3	6,43e6	2,11e-4	64,8
quimera 2C10	6,88e6	5,22e-5	9,1	quime ra 2C10	2,55e7	5,62e-4	22,9

Los datos son la media de un número de conjuntos de datos separados (n), se muestran la media y la desviación típica, con la desviación típica entre paréntesis. Los valores para los ciclos a 25°C y 37°C para H1L1 y H1L2
5 obtenidos a partir de la crisis a cinco temperaturas diferentes incluyen en este conjunto de datos.

7.4.3 Evaluación de las variantes humanizadas de 2C10c en un ELISA de unión a IL-18

10

Se realizó un ELISA con las nueve variantes humanizadas al menos seis veces usando diversos lotes de preparación de anticuerpos purificada. Las Figuras 4A-4C muestran datos representativos de un experimento que generó la clasificación de los valores de CE50 que se ilustra en la Tabla 7. Se inmovilizó

15 IL-18 humana en placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp usando 2,5 µg/ml de

16D10 (anticuerpo monoclonal de ratón no neutralizador) para capturar 5 ng/ml de IL-18 recombinante humana. Los anticuerpos humanizados contra IL-18 se añadieron a diversas diluciones. Los anticuerpos humanizados unidos se detectaron usando conjugado específico de Fc contra IgG humano (Sigma A0170).

Tabla 7: Valores crecientes de CE50 de las variantes humanizadas de 2C10 (expresadas en [µg/ml])

	2C10c	H3L2	H3L3	H1L1	H1L2	H1L3	H2L2	H3L1	H2L3	H2L1
CE50*	0,007	0,008	0,009	0,010	0,011	0,011	0,012	0,013	0,016	0,021

*Todos los ET estaban entre 0,001 y 0,002

La potencia de todas las variantes parecen ser muy similar a la quimera 2C10, lo que sugiere que la humanización había provocado muy poca pérdida de la potencia. Aunque los valores de CE50 generados por varias repeticiones de estos ensayos sí generaron una clasificación de las variantes, el ELISA por sí solo no permitió una distinción clara entre estas variantes (véase la Tabla 7 y las Figuras 4A-4C). Se logró una cierta distinción entre las variantes usando Biacore™ (secciones 7.4.1 y 7.4.2) lo que provocó que sólo cuatro variantes se examinarán en más detalle en diversos experimentos repetidos independientes usando y IL-18 humana y de rhesus (Tabla 8, Figura 5 [humana] y 6 [rhesus]).

Tabla 8: Valores de CE50 de seis experimentos repetidos independientes para cuatro variantes humanizadas seleccionadas para determinar la unión a IL-18 humana.

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

7.4.4 Evaluación de variantes de H1 humanizadas de 2C10 en un ELISA de unión a IL-18

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

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

	CE50 (ng/ml)	Error típico
Incubaciones a temperatura ambiente		
En presencia de suero:		
Quimera 2C10	7,296	0,358
H1L1	10,189	0,512
H1L2	9,791	0,471
H1L3	8,989	0,411
En tampón de bloqueo:		
Quimera 2C10	3,814	0,068
H1L1	3,315	0,136
H1L2	3,552	0,079
H1L3	3,790	0,133
Incubaciones a 37°C		
En presencia de suero:		
Quimera 2C10	10,140	1,254
H1L1	12,069	0,740
H1L2	9,791	0,471
H1L3	11,438	1,861
En tampón de bloqueo:		
Quimera 2C10	3,794	0,114
H1L1	3,430	0,104
H1L2	3,404	0,145
H1L3	3,334	0,222

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

5

7.4.5 Evaluación de la estabilidad de anticuerpos con variantes de H1 humanizadas a 37°C

La estabilidad en almacenamiento de las tres variantes de H1 humanizadas:

- 10 H1L1, H1L2 y H1L3 se se evaluó durante un período de tiempo de 14 días a 37°C tanto en suero humano como en solución salina tamponada con fosfato. Los anticuerpos se diluyeron a 50 µg/ml, la estabilidad se evaluó mediante un ELISA de unión a IL-18 unión, después del período de incubación de 0, 1, 4, 6, 8, y 14 días a 37°C. Para el ELISA de unión a IL-18, 16D10 (anticuerpo
- 15 monoclonal de ratón no neutralizante) se inmovilizó sobre placas Nunc Maxisorp para capturar 5 ng/ml de IL-18 humana recombinante. Se añadieron los anticuerpos humanizados contra IL-18 muestreados en tiempos diferentes durante el transcurso de la incubación a 37°C. Los anticuerpos humanizados unidos se detectaron usando conjugado específico de Fc contra IgG humano.

20

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

25

7.5 Unión de H1L2 a IL-18 humana en presencia de líquido sinovial

Se realizó un ELISA en el que al líquido sinovial humano al 50% se añadió IL-18 humana recombinante de desde 500 ng/ml hasta 0 ng/ml. La IL-18 contenida en esta solución se aplicó después a pocillos de una placa de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) recubierta con el anticuerpo H1L2. La IL-18 unida se detectó después mediante un anticuerpo biotinilado contra IL-18 (D045-6, MBL) y estreptavidina-HRP. La valoración de IL-18 humana recombinante en líquido sinovial (SF) al 50% produjo casi la misma curva en la valoración de IL-18 recombinante humana en tampón solamente con un ligero desplazamiento del valor máximo. Véase la Figura 7. Esto demuestra la capacidad del anticuerpo de unirse a hIL-18 incluso en presencia de líquido sinovial humano al 50% que imita mejor el entorno de unión que encontrará el anticuerpo en una situación terapéutica.

7.5.1 Unión a IL-18 en presencia de proteína de unión de IL-18 (IL18bp)

Se usó la tecnología Biacore™ (Biacore™ 3000) y ELISA para determinar si H1L2 todavía puede unirse a y L18 en presencia de IL18bp humana. IL18bp tiene una afinidad elevada por IL-18 y actúa como inhibidor natural de la función de IL-18 (Figura 8, Figura 9 A y B, Tabla 10 y Tabla 11).

Análisis mediante Biacore

En resumen, se inmovilizó Proteína A sobre un chip CM5 con una densidad de aproximadamente 3000 unidades de resonancia (RU) mediante acoplamiento de amina primaria. La proteína de unión a Fc-IL-18 recombinante (R&D Systems), se pasó después a una concentración de 3µg/ml con un caudal de

ADA

10µl/minuto durante un minuto; esto produjo una captura de aproximadamente 1400 RU de la proteína de unión de IL-18. Después se pasó IL-18 sobre la proteína de unión de IL-18 capturada a una concentración de 30 nM, un caudal de 10µl/minuto durante 5 minutos. Después de esto, el anticuerpo progenitor 2C10 de rata se pasó a una concentración de 10 nM sobre la superficie de proteína de unión de IL-18/IL-18 durante 3 minutos con un caudal de 30µl/minuto durante 3 minutos. Si interfiriera el epítipo reconocido por el anticuerpo 2C10 anticuerpo en IL-18 con el sitio de interacción de la proteína de unión de IL-18, entonces no se observaría ninguna señal de unión. La Figura 10 demuestra que 2C10 se une a hIL-18 que a su vez había sido capturado por hIL-18BP, lo que indica que los sitios de unión para C10 y hIL-18BP no están superpuestos.

Tabla 10: Efecto de IL-18BP sobre las células sinoviales que segregan IFNγ en la artritis reumatoide (RA)

Muestra IL-18BP estado	Control	IL-12	IL-18	IL-12 + IL-18
RA1	ND	0,63	ND	1,63
.	ND	0,29	ND	0,13
RA2	ND	0,85	ND	0,79
.	ND	0,10	ND	0,10
RA3	ND	1,06	ND	1,62
.	ND	0,32	ND	0,40

Kawashima, M. y Miossec, P., Arthritis & Rheumatism, Vol. 48, N.º. 3 (Marzo de 2003), páginas 631 - 637

Análisis mediante ELISA

La unión de MAb humanizado de rata H1L2 o 2C10 a IL18bp capturada unida a IL-18 humana se analizó en ELISA de unión directa en el que se recubrió la proteína de fusión IL18bp humana-Fc (R&D Systems #119-BP) sobre placas Nunc Maxisorp a 0,5 µg/ml. Se añadió IL-18 (en reactivo de la casa) a 100 ng/ml en tampón de bloqueo (PBS que contenía BSA al 1% p/v). Los anticuerpos purificados se añadieron a concentraciones que variaban en el intervalo de 0,5 ng/ml a 1µg/ml. El anticuerpo unido se detectó con un conjugado de inmunoglobulina específica contra la cadena ligera kappa humana y HRP (Sigma) o contra IgG de rata HRP. Las Figuras 18A y B ilustran los resultados obtenidos.

7.6 Bioensayos in vitro

7.6.1 actividad de las construcciones humanizadas sobre la neutralización de la liberación de IFN-8 estimulada con IL18 en la línea celular KG-1

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

Se evaluaron las nueve variantes humanizadas para determinar su capacidad de inhibir la liberación de IFN- γ estimulada por IL-18 células KG-1 (Tabla 12 y

Figura 11).

Tabla 12: Valores de CI50 para la neutralización de IL-18 recombinante humano en un bioensayo en KG-1 usando las nueve variantes humanizadas.

Anticuerpo	CI50
H1L1	0,071
H1L2	0,033
H1L3	0,027
H2L1	0,145
H2L2	0,054
H2L3	0,046
H3L1	0,027
H3L2	0,035
H3L3	0,034
2C10(1)	0,042
2C10(2)	0,039

5

Se realizaron al menos seis experimentos repetidos adicionales en cuatro variantes humanizadas preferidas que habían demostrado la mejor afinidad por IL-18 humana recombinante y de rhesus basándose en el análisis por Biacore™. La Figura 8 ilustra un resultado representativo para las cuatro
10 variantes humanizadas preferidas y para H1L1, y la Tabla 13 Resume los resultados de estos ensayos realizados todos con el mismo material del 11 de proteínas derivado de células CHOe1a.

Tabla 13: Valores de CI50 para la neutralización de IL-18 recombinante humana en un bioensayo en KG-1 usando 4 ó 5 variantes humanizadas seleccionadas.

	CI50 media para 2C10	H1L1	H1L2	H1L3	H3L2	H3L3	IL-18 bp
Expt. 1	0,046	n.d.	0,062	0,064	0,064	0,057	n.d.
Expt. 2	fuera de límites	n.d.	fuera de límites	fuera de límites	fuera de límites	fuera de límites	n.d.
Expt. 3 Placa 1	0,074	n.d.	0,109	0,144	0,090	0,091	n.d.
Expt. 3 Placa 2	0,075	n.d.	0,173	0,156	0,128	0,115	n.d.
Expt. 4	0,017	0,091	0,017	0,044	fuera de límites	0,016	fuera de límites
Expt. 5 (Est. EC80)	0,075	0,757	0,122	0,085	0,072	0,056	0,054
Expt. 5 (Est. CE50)	0,044	0,180	0,047	0,046	0,039	0,038	0,034

105

Expt. 6 (Est. CE80)	fuera de límites	0,078	0,023	0,021	fuera de límites	0,013	0,007
Expt. 6 (Est. CE50)	0,020	0,069	0,019	0,019	0,015	0,016	0,01

En los casos en los que H1L1 se comparó con otras variantes humanizadas, H1L1 demostró una potencia menor comparada con las otras cuatro construcciones humanizadas analizadas y también comparada con el MAb progenitor 2C10.

Se realizaron análisis adicionales con los cuatro anticuerpos monoclonales, que se compararon para determinar la capacidad de inhibir la liberación de INF γ estimulada por IL-18 por las células KG-1: 2C10 y las variantes humanizadas derivadas de 2C10 (H1L1, H1L2 y H1L3). El bioensayo con KG-1 se realizó en placas de 96 pocillos incubando 50 ng/ml de IL-18 humana recombinante y diversos concentraciones de los anticuerpos específicos para IL-18 (que variaban en el intervalo de 2 μ g/ml a 7,8 ng/ml, en diluciones dobles) o un control negativo con otro isotipo (Synagis, anti-RSV anticuerpo) durante 1 hora a 37°C y 5%CO $_2$, seguido de la adición de 3,10⁵ células KG-1 por pocillo. Las placas se incubaron finalmente durante 20-24 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%. El sobrenadante se recolectó y se determinó la producción de IFN γ usando un kit ELISA DE IFN γ humano comercial (Biosource AHC4432; AHC4539).

108

Se han realizado tres experimentos. Los resultados para la inhibición de la producción de IFN γ estimulada por IL-18 se normalizaron con el control negativo. El análisis estadístico se encaminó a obtener una estimación de la CI50 para cada mAb en en cada experimento tras el ajuste para las respuestas en Synagis. Las estimaciones de las CI50 se analizaron después estadísticamente produciendo una estimación global de la CI50 para cada mAb con un intervalo de confianza del 95% (es decir un intervalo estadísticamente plausible). Cada variante humanizada finalmente se comparó con 2C10 usando la prueba de Dunnett.

10

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

15

Tabla 14: Valores de CI50 para la neutralización de la producción de IFN γ estimulada por IL-18 en el bioensayo con KG-1

Anticuerpo monoclonal	CI50 media μ g/ml (IC al 95%)	Cambio % con respecto a 2C10 (IC al 95%)	Valor p en Dunnett
2C10	0,095 (0,071,0,127)	-	-
H1L1	0,352 (0,264,0,470)	269,4 (117,2,528,2)	[0,0001]
H1L2	0,154 (0,112,0,211)	61,5 (-7,6,182,0)	0,0968
H1L3	0,164 (0,121,0,221)	71,6 (-0,4,195,8)	0,0519

107

H1L1 es de forma estadísticamente significativa menos potente que 2C10 ($p < 0,001$).

Las otras variantes humanizadas no son significativamente diferentes de 2C10, aunque la comparación entre H1L3 y 2C10 está al límite.

5

7.6.2 Actividad de H1L2 sobre la neutralización de la liberación de IFN- γ en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas estimuladas

- 10 Se estimularon PBMC humanas de tres donadores con IL-18 humana recombinante y anticuerpo contra CD3 y se estudió el efecto de la adición de una dilución en serie de cuatro variantes de anticuerpos humanizados seleccionadas. Para cada anticuerpo 2C10 progenitor donador y se incluyó IL18bp como comparación. Para dos de los tres donadores, la estimulación con
- 15 IL-18 e Ig contra CD3 no tuvo éxito y no se detectó IFN- γ . Para el residuo de los donadores, los resultados fueron muy variables a concentraciones bajas, pero pudo lograrse una inhibición completa de la producción de IFN- γ por IL-18 añadiendo diversos anticuerpos contra IL-18 que incluían las variantes humanizadas. Véase la Figura 14.

20

- También se realizaron experimentos con PBMC humanas estimuladas con LPS que provoca la producción de IL-18 y la liberación asociada de IFN γ . La producción de IFN γ se indujo mediante LPS de forma dependiente de la concentración y la adición de anticuerpo monoclonal 2C10 progenitor a una
- 25 concentración fija de 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibió completamente esta estimulación, lo que

1108

indica que el efecto está mediado por IL-18 y que la IL-18 endógena puede ser neutralizada (no se muestran datos). Esto pudo demostrarse también en sangre completa, pero el efecto de inhibición con 2C10, aunque dependiente de la dosis, fue menos evidente (no se muestran datos). La Figura 9 ilustra los resultados de un experimento con 3 donadors independientes y la inhibición con 2C10 monoclonal progenitor de rata, H1L2 y IL18bp. Los donadors 1 y 3 dieron resultados similares, mientras que el donador 2 no mostró liberación de IFN γ en la estimulación con LPS (no se muestra). La liberación de IFN γ mediada por IL-18 puede inhibirse completamente en presencia de suero humano al 10% o 25% añadiendo >1 μ g/ml de anticuerpo o IL18bp. La inhibición puede observarse ya a 10 ng/ml y más, y los valores de CI50 para esta inhibición en presencia de suero humano al 10% o 25% no se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Valores de CI50 para la inhibición de la liberación de IFN γ estimulada por LPS provocada mediante la neutralización de IL-18 endógena usando 2C10, H1L2, o IL18bp en presencia de suero humano

	IL18bp	H1L2	2C10
Donador 1 suero al 10%	0,024	0,102	0,023
Donador 1 suero al 25%	0,064	0,113	0,069
Donador 3 suero al 10%	0,032	0,042	0,033

Donador 3 suero al 25%	0,046	0,108	0,086
---------------------------	-------	-------	-------

7.6.3 Resumen de unión a ortólogos de IL-18

Se examinó la unión de anticuerpo con IL-18 de otras especies usando ELISA y Biacore y también bioensayo con células KG-1. Inicialmente esto se realizó usando 2C10 progenitor y 2C10c quimérico para IL-18 de rhesus/macaco pero se repitió con algunas de las variantes humanizadas. Se analizó 2C10 progenitor para determinar la unión a IL-18 de cerdo, ratón y rata y se analizaron las 4 variantes humanizadas mejores para determinar la unión a IL-18 de rhesus/macaco y perro usando Biacore y ELISA. Se realizó un bioensayo con KG-1 con IL-18 de rhesus/macaco y tres anticuerpos monoclonales, 2C10 quimérico y de forma representativa para las variantes humanizadas, H3L3. Dada la similitud entre todas las variantes humanizadas, es probable que esto sea representativo para otras variantes generadas, incluyendo H1L2 (véase Tabla 15, Figura 8).

Tabla 15: Resumen de la unión de ortólogos de MAb 2C10 progenitor de rata, 2C10c quimera de rata y humano y un grupo seleccionado de 4 variantes humanizadas

	IL-18 de Rhesus/macaco	IL-18 de perro	IL-18 de ratón y rata	IL-18 de cerdo
--	---------------------------	-------------------	-----------------------------	-------------------

110

MAB 2C10 de rata	ELISA (+) KG-1 (+)	ELISA (-)	ND	ND
2C10 quimérico (rata/humano)	ELISA (+) KG-1 (+) Biacore™ (+)	ELISA (-) Biacore™ (-)	ELISA (-) Biacore™ (-)	ELISA (-) Biacore™ (-)
Humanizados (H1L2, H1L3, H3L1, H3L3)	ELISA (+) KG-1 (+) sólo H3L3 analizado Biacore™ (+)	ELISA (-)	ELISA (-)	ELISA (-)

ND no determinado; + unión detectable

7.7 Estudios de dicroismo circular y desnaturalización térmica de anticuerpos contra IL-18

5

Se usaron estudios de dicroismo circular (DC) para estudiar los cambios estructurales secundarios de los anticuerpos contra IL-18 en función de la temperatura, en especial desde 25°C a 37°C. Los estudios de desnaturalización térmica de estos mismos anticuerpos se realizaron para

10 determinar su estabilidad térmica y sus temperaturas de fusión (Tf.)

Procedimiento de DC: los espectros de DC se obtuvieron en un espectrómetro Applied Photophysics Chirascan que barría desde 180nm hasta 280nm en

AAA

etapas de 0,5 nm y con una anchura de banda de 1nm. El tiempo de adquisición por cada punto fue de 5 segundos. Las muestras se diluyeron a ~ 0,2 mg/ml en PBS y se introdujeron en una cubeta con una longitud de recorrido de 1 mm. Los espectros de cada proteína se obtuvieron con el baño 5 termostático fijado a 4°C, 25°C y 37°C. Las temperaturas reales de las muestras se determinaron mediante una sonda introducida en el líquido de la cubeta y estaban en ~3°C de la temperatura fijada.

Procedimiento de Tf: todas las proteínas se diluyeron a 0,2 mg/ml en naranja 10 Sypro en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1:1000. La emisión de fluorescencia se midió a 620 nm (excitación a 490 nm) usando un aparato Bioneer Exicycler en cada intervalo de 0,5 °C mientras la temperatura de la muestra se incrementaba desde 10°C a 95°C esperando 10 segundos a cada temperatura. Las curvas de desnaturalización se ajustaron en una isoterma de 15 fusión estándar usando Grafit.

Tal como se esperaba, la comparación de la forma de los espectros de DC de los cuatro anticuerpos mostró que su estructura era de lámina beta y esencialmente con la misma arquitectura. En el intervalo de temperatura desde 20 4°C a 37°C los tres anticuerpos :

H1L1

H1L2

H1L3

no muestran cambios significativos en su estructura secundaria, según se 25 reveló mediante DC. Sin embargo, el anticuerpo quimera 2C10 si mostró un

ligero descenso de la estructura en este intervalo de temperaturas. Esto es consistente con la pauta de estabilidad térmica que se presenta en la Tabla 16 siguiente.

5 **Tabla 16: Desnaturalización térmica de anticuerpos contra IL-18**

Anticuerpo	H1L1	H1L2	H1L3	quimera
Tf	73°C	70°C	67°C	65°C

Tf = temperatura de desnaturalización/fusión

H1L1, H1L2 y H1L3 son claramente estables mucho más allá de 37°C sin signos de desnaturalización a la temperatura corporal. Por lo tanto es
10 improbable que la diferencia entre sus estabilidades térmicas confiera ventajas diferenciales a las temperaturas corporales y ambientales normales.

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo
contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una
5 cadena pesada y una cadena ligera que tiene las siguientes regiones
determinantes de la complementariedad (CDR):

CDRH1:SEC. ID. N°: 1

CDRH2:SEC. ID. N°: 2

CDRH3:SEC. ID. N°: 3

10 CDRL1:SEC. ID. N°: 4

CDRL2:SEC. ID. N°: 5

CDRL3:SEC. ID. N°: 6.

2. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una
cadena pesada y una cadena ligera que tiene las siguientes CDR:

15 CDRH1:SEC. ID. N°: 1

CDRH2:SEC. ID. N°: 2

CDRH3:SEC. ID. N°: 3

CDRL1:SEC. ID. N°: 4

114

CDRL2:SEC. ID. N°: 5

CDRL3:SEC. ID. N°: 6

5 en las que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera está sustituido por el residuo correspondiente que se encuentra en el anticuerpo donador del que se derivan las CDR.

3. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR que se derivan de un anticuerpo donador injertado sobre una estructura aceptora humana, anticuerpo contra interleuquina 18 que comprende CDR que tienen las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en
10 las que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera de dicho anticuerpo contra interleuquina 18 es idéntico al residuo que se encuentra en la posición correspondiente de la estructura del anticuerpo donador.

4. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, anticuerpo que
15 comprende una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera.

5. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada que tiene CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 y una cadena ligera que tiene CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6, en el que dichas CDR de la cadena ligera se derivan de un anticuerpo donador
20 que tiene una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera del anticuerpo donador.

MS

6. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR de un anticuerpo donador y una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera de dicho anticuerpo humanizado, en el que el anticuerpo donador es 2C10 o una variante estructural del mismo (es decir comprende las mismas CDR pero una estructura diferente de 2C10, véase la patente de Estados Unidos 6.706.487).
7. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:
- (a) una cadena pesada que tiene CDR con las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora y
- (b) una cadena ligera que tiene CDR con las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre estructura de cadena ligera humana aceptora, en el que dicha estructura de cadena ligera humana aceptora comprende la SEC. ID. N°: 38 y en la que posición 71 de la cadena ligera es una tirosina.
8. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:
- (a) una cadena pesada que comprende CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 y;
- (b) una cadena ligera que comprende CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera humana aceptora, en el que dicha estructura de cadena ligera aceptora de dicho anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 es una variante de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que dicha

116

variante comprende una tirosina en la posición 71 y, en la que dicha variante comprende una identidad del 75% o superior con la estructura que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38.

9. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- 5 (a) CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 derivadas de un anticuerpo donador, anticuerpo donador que comprende una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera del anticuerpo donador;

(b) una estructura aceptora humana, estructura aceptora que comprende una fenilalanina en la posición 71 de la cadena ligera humana;

- 10 en el que el anticuerpo contra interleuquina 18 comprende una tirosina en la posición 71 de la cadena ligera.

10. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) CDR que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 derivadas de un anticuerpo donador, anticuerpo donador que comprende un aminoácido
15 aromático en la posición 71 de la cadena ligera del anticuerpo donador;

(b) una estructura aceptora humana, estructura aceptora que comprende, en la posición 71 de la estructura de cadena ligera aceptora, un tipo de aminoácido aromático diferente del aminoácido aromático de la parte (a);

- en el que el anticuerpo contra interleuquina 18 comprende una cadena ligera
20 que tiene en la posición 71 un aminoácido aromático derivado del anticuerpo de la parte (a).

117

11. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18, anticuerpo que presenta una afinidad de unión (KD) de 90 pM o superior con respecto a IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo Biacore™ T100) a 37°C.
- 5 12. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende CDR tal como se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y presenta una afinidad de unión (KD) de 90 pM o superior con respecto a IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo Biacore™ T100) a 37°C.
- 10 13. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18, anticuerpo que presenta una velocidad de disociación (k_d) de 0,0002 (1/s) o inferior con respecto a unión de IL-18 humana cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo Biacore™ T100) a 37°C.
14. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:
- 15 (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que uno o más residuo/s de la/s posición/es 27, 28, 29, 93, 39, 40,
- 20 36, 71, 89, 91 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;
- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo

donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que la posición 71 y opcionalmente uno o más (por ejemplo todos) residuo/s de la/s posición/es 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

15. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;
- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera de dicho anticuerpo contra interleuquina 18 es idéntico al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

1119

16. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 39, 40, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

(b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera es idéntico al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

17. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura aceptora que comprende regiones estructurales derivadas de la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 36, 39, 40, 71, 89, 91, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera es idéntico al residuo correspondiente de la cadena ligera del anticuerpo donador.

18. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;
- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que los residuos de las posiciones 71, 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena ligera del anticuerpo donador.

19. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93, 39, 40 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;
- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que los residuos de las posiciones 71, 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena ligera del anticuerpo donador.

20. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2 y 3 injertadas sobre una estructura de cadena pesada humana aceptora, estructura de cadena pesada aceptora que tiene la secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 37, en la que los residuos de las posiciones 27, 28, 29, 93, 39, 40, 36, 71, 89, 91 de la cadena pesada son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena pesada del anticuerpo donador;

- (b) una cadena ligera que comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador, CDR que tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 injertadas sobre una estructura de cadena ligera aceptora, estructura de cadena ligera aceptora que tiene una secuencia que se describe en la SEC. ID. N°: 38, en la que los residuos de las posiciones 71, 45, 83, 84, 85 de la cadena ligera son idénticos a los residuos correspondientes de la cadena ligera del anticuerpo donador.
21. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada que se selecciona a partir del grupo constituido por: SEC. ID. N°: 9, SEC. ID. N°: 17, SEC. ID. N°: 21; y una cadena ligera que se selecciona a partir del grupo constituido por: SEC. ID. N°: 13, SEC. ID. N°: 29.
22. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 9 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 13 o una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 9 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 29.
23. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 17 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 13 o una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 17 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 29.
24. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 21 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 13 o una cadena pesada de la SEC. ID. N°: 21 y una cadena ligera de la SEC. ID. N°: 29.

25. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende:

(a) una cadena pesada que tiene CDR que permiten la unión específica a IL-18 humana;

(b) una cadena ligera que comprende una estructura aceptora que tiene CDR con las secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 4, 5 y 6 y que tiene un residuo tirosina en la posición 71.

26. Un anticuerpo humanizado contra interleuquina-18 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la relación entre la velocidad de disociación (k_d) de dicho anticuerpo en la unión a IL-18 humana a 25°C y velocidad de disociación (k_d) de dicho anticuerpo en la unión a IL-18 humana a 37°C es 1:5 (o 1: menos de 5), y, en el que dicho anticuerpo comprende CDR derivadas de un anticuerpo donador y una estructura aceptora humana, y, en el que un residuo de la posición 71 de la cadena ligera de la estructura aceptora humana está sustituido por el residuo correspondiente del anticuerpo donador.

15

27. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 26, en el que las CDR tienen secuencias que se describen en las SEC. ID. N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

28. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27, en el que el residuo de la posición 71 de la cadena ligera de la estructura aceptora humana es un aminoácido aromático, preferiblemente fenilalanina, y el residuo correspondiente en el anticuerpo donador es un tipo diferente de aminoácido aromático, preferiblemente tirosina.

20

29. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra interleuquina 18 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
30. Uso de un anticuerpo contra interleuquina 18 de acuerdo con una
5 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, enfermedades artríticas tales como artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y soriasis.
31. Uso de la reivindicación 31 en la fabricación de un medicamento para el
10 tratamiento de artritis reumatoide.
32. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, enfermedades artríticas tales como artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y soriasis.
- 15 33. Un procedimiento de tratar a un paciente humano que padece una enfermedad autoinmunitaria tal como esclerosis múltiple, enfermedades artríticas tales como artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y soriasis, procedimiento que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un
20 anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28.
34. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, procedimiento que comprende

cultivar una célula hospedera transformada o transfectada con un vector que comprende un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo en condiciones que permitan la expresión de dicho anticuerpo.

35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que dichas condiciones
5 incluyen cultivar dicha célula hospedera en dicho medio de cultivo sin suero.

36. El procedimiento de la reivindicación 34 ó 35, en el que dicha célula hospedera es una célula de mamífero.

37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que dicha célula hospedera es CHO o NS0.

10 38. El procedimiento de la reivindicación 37, en el que la célula CHO es una célula CHO DHFR⁻ antes de la transfección o transformación con dicho polinucleótido.

39. Un procedimiento de selección de un anticuerpo (en particular un anticuerpo que inhibe la interacción entre un ligando y un receptor tal como un
15 anticuerpo contra interleuquina 18 que se describe en la presente memoria) para uso terapéutico, procedimiento que comprende:

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

(b) medir la afinidad de unión (usando por ejemplo resonancia de plasmón

superficial, tal como Biacore™) del anticuerpo por un antígeno al que el anticuerpo se une específicamente a una temperatura entre 20 y 25°C (preferiblemente 25°C);

- 5 (c) seleccionar dicho anticuerpo para uso terapéutico si la afinidad de (a) es superior a la afinidad de (b), preferiblemente si dicha afinidad de (a) es 2 veces o más, más preferiblemente 4 veces o más la afinidad de la etapa (b).

40. Un procedimiento de selección de un anticuerpo (en particular un anticuerpo que inhibe la interacción entre un ligando y un receptor tal como un anticuerpo contra interleuquina 18 que se describe en la presente memoria)
10 para uso terapéutico, procedimiento que comprende:

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

- 15 (b) medir la velocidad de disociación (usando por ejemplo resonancia de plasmón superficial, tal como Biacore™) del anticuerpo de un antígeno al que el anticuerpo se une específicamente, a una temperatura entre 20 y 25°C (preferiblemente 25°C);

- (c) seleccionar dicho anticuerpo para uso terapéutico si la velocidad de
20 disociación de (a) es menor que la velocidad de disociación de (b).

127

SECUENCIAS

SEC. ID. Nº: 1

GYYPH

5

SEC. ID. Nº: 2

RIDPEDDSTKYAERFKD

10

SEC. ID. Nº: 3

WRIYRDSSGRPFYVMDA

SEC. ID. Nº: 4

15 LASEDIYTYLT

ACDRH1:SEC. ID. Nº: 5

GANKLQD

20

SEC. ID. Nº: 6

LQGSKFPLT

25

128

SEC. ID. N°: 7

MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDYFGKLESKLSVIRNLNDQ
VLFDQGNRPLFEDMTDSDCRADNPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKIS
TLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLA
5 CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE

SEC. ID. N°: 8

ATGGCTGCTGAACCAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTGGCAATGAAA
TTTATTGACAATACGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGGAAT
10 CAGATTACTTTGGCAAGCTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTTGAA
TGACCAAGTTCTCTTCATTGACCAAGGAAATCGGCCTCTATTTGAAGATAT
GACTGATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGGACCATATTTATTATAAG
TATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGTATGGCTGTAACCTATCTCTGTGAA
GTGTGAGAAAATTTCAACTCTCTCCTGTGAGAACAAAATTATTTCTTTAAG
15 GAAATGAATCCTCCTGATAACATCAAGGATACAAAAAGTGACATCATATTCT
TTCAGAGAAGTGTCCCAGGACATGATAATAAGATGCAATTTGAATCTTCAT
CATACGAAGGATACTTTCTAGCTTGTGAAAAAGAGAGAGACCTTTTTAACT
CATTTTGAAAAAAGAGGATGAATTGGGGGATAGATCTATAATGTTCACTGTT
CAAAACGAAGACTAG

20

SEC. ID. N°: 9

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRI
25 DPEDDSTKYAERFKDRVMTEDTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCTTWRIYR

DSSGRPFYVMDAWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
5 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC. ID. N°: 10

10

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCA
GCGTCAAGGTGTCCTGTAAGGTGTCCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTAC
TTCCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCA
GAATCGACCCCGAGGACGACAGCACCAAGTACGCCGAGCGGTTCAAGGA
15 CAGGGTGACCATGACCGAGGACACCAGCACCGATACCGCCTACATGGAG
CTGTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTACCACCTG
GCGGATCTACAGAGACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGATGCCT
GGGGCCAGGGCACA CTA GTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCC
CAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACA
20 GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCG
TGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGC
CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAA
GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGAC
25 AAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC

CCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC
AGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACC
CTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC
CAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTG
5 TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA
GTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCA
GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCC
TAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGA
AGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
10 GCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGC
AGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA
GGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACT
ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

15

SEC. ID. Nº: 11

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRI
DPEDDSTKYAERFKDRVMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCTTWRIYR
20 DSSGRPFYVMDAWGQGLTVTVSS

SEC. ID. Nº: 12

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCA
25 GCGTCAAGGTGTCCTGTAAGGTGTCCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTAC

TTCCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCA
GAATCGACCCCGAGGACGACAGCACCAAGTACGCCGAGCGGTTCAAGGA
CAGGGTGACCATGACCGAGGACACCAGCACCGATACCGCCTACATGGAG
CTGTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTACCACCTG
5 GCGGATCTACAGAGACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGATGCCT
GGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEC. ID. Nº: 13

10 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTIITWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQ
DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

15

SEC. ID. Nº: 14

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGA
TAGAGTGACCATCACCTGCCTGGCCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGA
20 CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGC
GCCAACAAGCTGCAGGACGGCGTGCCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCT
CCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTC
GCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTT
25 ATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG

TGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG
GTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAG
CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCAC
5 CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEC. ID. Nº: 15

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTIITWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQ
10 DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEC. ID. Nº: 16

15 GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGA
TAGAGTGACCATCACCTGCCTGGCCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGA
CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGC
GCCAACAAGCTGCAGGACGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCT
CCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTT
20 GCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEC. ID. Nº: 17

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYYFHWVRRRPGKGLEWMGRI

DPEDDSTKYAERFKDRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCTTWRIYR
DSSGRPFYVMDAWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
5 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 SEC. ID. N°: 18

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATT
TCCACTGGGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAG
15 GATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAG
AGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGA
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCACATGGCGG
ATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGG
CCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
20 TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGT
GGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
25 AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC

ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
5 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
10 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

15

SEC. ID. Nº: 19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRRRPGKGLEWMGRI
20 DPEDDSTKYAERFKDRVMTEDTSTDATYMESSLRSEDVAVYYCTTWRIYR
DSSGRPFYVMDAWGQGTLVTVSS

SEC. ID. Nº: 20

25 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT

CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATT
TCCACTGGGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAG
GATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAG
AGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGA
5 GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCACATGGCGG
ATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGG
CCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEC. ID. Nº: 21

10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRI
DPEDDSTKYAERFKDRVTMTADTSTDYMEISSLRSEDATYFCTTWRIYR
DSSGRPFYVMDAWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
15 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

SEC. ID. Nº: 22

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATT
25 TCCACTTTGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAG

GATTGATCCTGAGGATGATAGTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAG
AGTCACCATGACCGCAGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGA
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTTTGTACCACATGGCGG
ATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGG
5 CCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGT
GGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
10 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCCTAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
15 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
20 AGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
25 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC. ID. N°: 23

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRI
DPEDDSTKYAERFKDRVMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATYFCTTWRIYR
5 DSSGRPFYVMDAWGQGTLVTVSS

SEC. ID. N°: 24

10 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATT
TCCACTTTGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAG
GATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAG
AGTCACCATGACCGCAGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGA
15 GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTTTGTACCACATGGCGG
ATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGG
CCAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

20 SEC. ID. N°: 25

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTIIITWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQ
DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ
25 ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

C

SEC. ID. N°: 26

5 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACA
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGC
AAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA
10 CTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGA
CCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAA
CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC
15 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGA
CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

20 SEC. ID. N°: 27

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTIITWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQ
DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

25

SEC. ID. N°: 28

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACA
5 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGC
AAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA
CTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGA
CCAAGCTGGAGATCAAA

10

SEC. ID. N°: 29

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTITWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQ
DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKR
15 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEC. ID. N°: 30

20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACA
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTCAACTCCTGATCTATGGTGC
AAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG
25 GGACAGATTATACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGAAGGG

GATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT
GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACA
5 ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

10

SEC. ID. N°: 31

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCLASEDIYTIITWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQ
DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK
15

SEC. ID. N°: 32

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
20 AGAGTCACCATCACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACTTATTTAACA
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGGAAAGCCCCTCAACTCCTGATCTATGGTGC
AAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTATACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGAAGGG
GATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGG
25 ACCAAGCTGGAGATCAAA

141

SEC. ID. Nº: 33

EVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGQGLEWIGRID
PEDDSTKYAERFKDRATLTAQTSSNTAiiNLSSLTSEDATYFCTTWRIYRDSS
5 GRPFYVMDAWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
10 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC. ID. Nº: 34

15 GAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCT
CTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGAAATAAGTACAGGATACTATTT
CCACTTTGTGAGGCGAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGG
ATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGG
20 GCGACGCTCACTGCACAAACATCCTCCAACACAGCCTACCTGAACCTCAG
CAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACTTATTTTTGTACCACATGGCGGAT
ATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGTC
AAGGAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC
25 TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG

GAAGTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA
5 CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
10 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
15 CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

20

SEC. ID. N°: 35

DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYTiITWYQQKPGKSPQLLIYGANKLQ
DGVPSRFSGSGSGTQYSLKISGIQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ

ESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNERGE
C

5 SEC. ID. N°: 36

GACATTCAAATGACCCAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAA
ACTGTCTCCATCGAATGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACAT
10 GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAA
ATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGC
ACACAGTATTCTCTCAAGATCAGCGGCATACAACCTGAAGATGAAGGGGAT
TATTTCTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTCCGGTTCTGGGACC
AAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
15 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT
GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACG
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
20 CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEC. ID. N°: 37

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGG
25 FDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCAT

ACDRH1:SEC. ID. N°: 38

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP

5

SEC. ID. N°: 39

WGQGTLVTVSS

SEC. ID. N°: 40

10

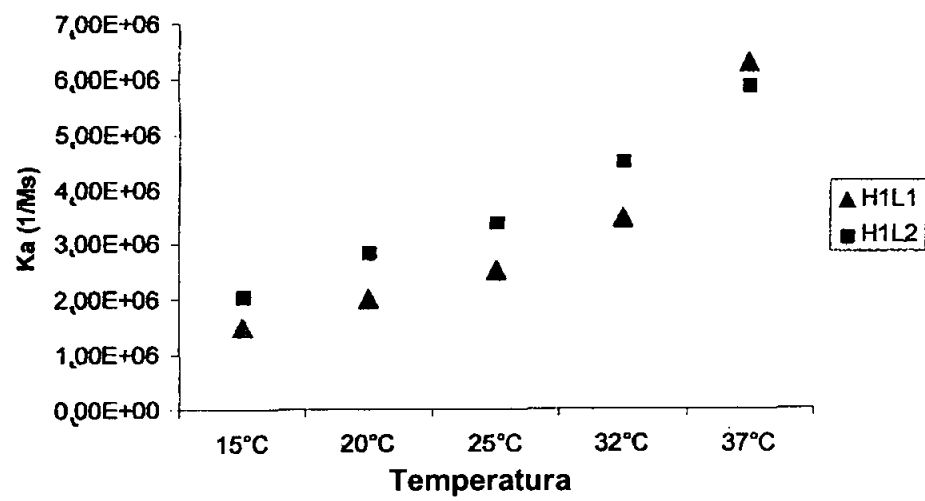
FGQGTKLEIK

Figura 1. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de asociación (ka) de H1L1 y H1L2

5

Ka de H1L1 y H1L2 frente a IL18 humana a diversas temperaturas

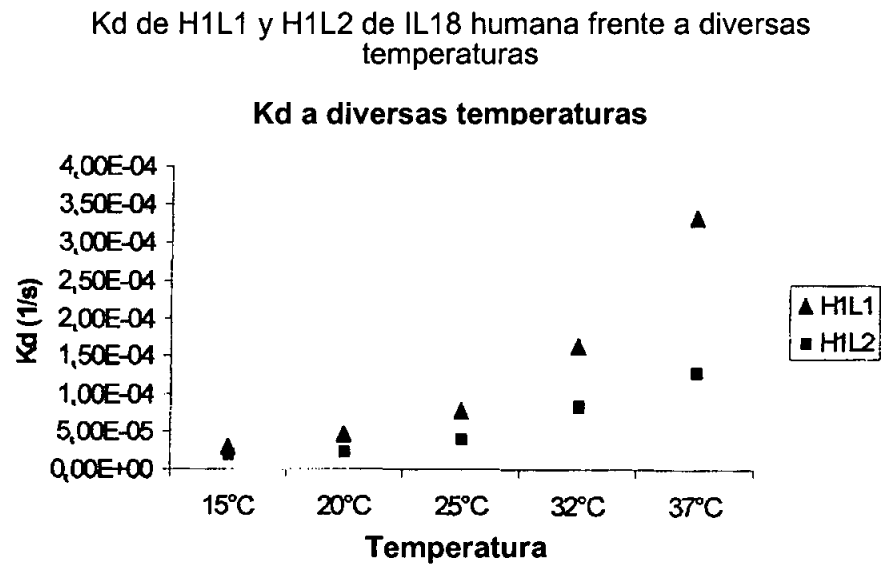
Ka a diversas temperaturas



10

19/6

Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de disociación (kd)



5

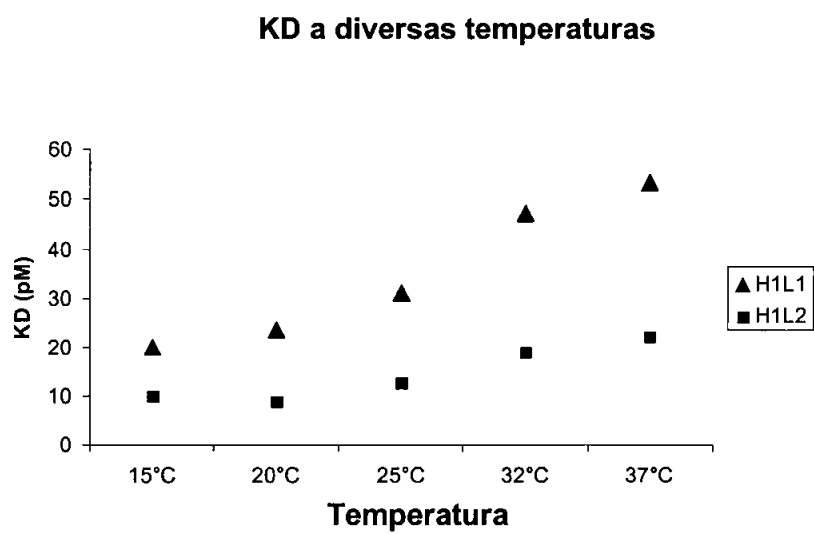
10

15

147

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

KD de H1L1 y H1L2 frente a IL18 humana a diversas temperaturas

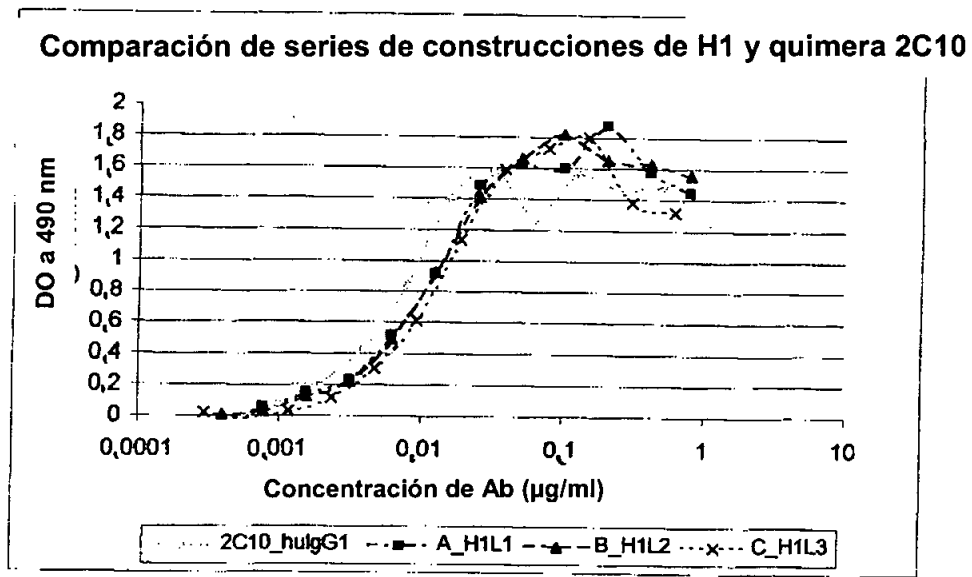


5

10

Figura 4.

A



B

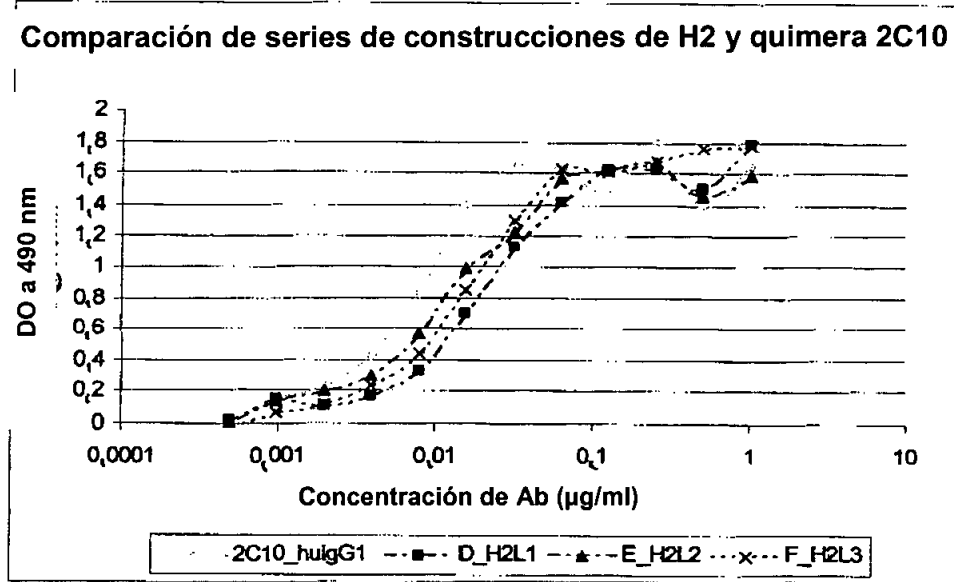


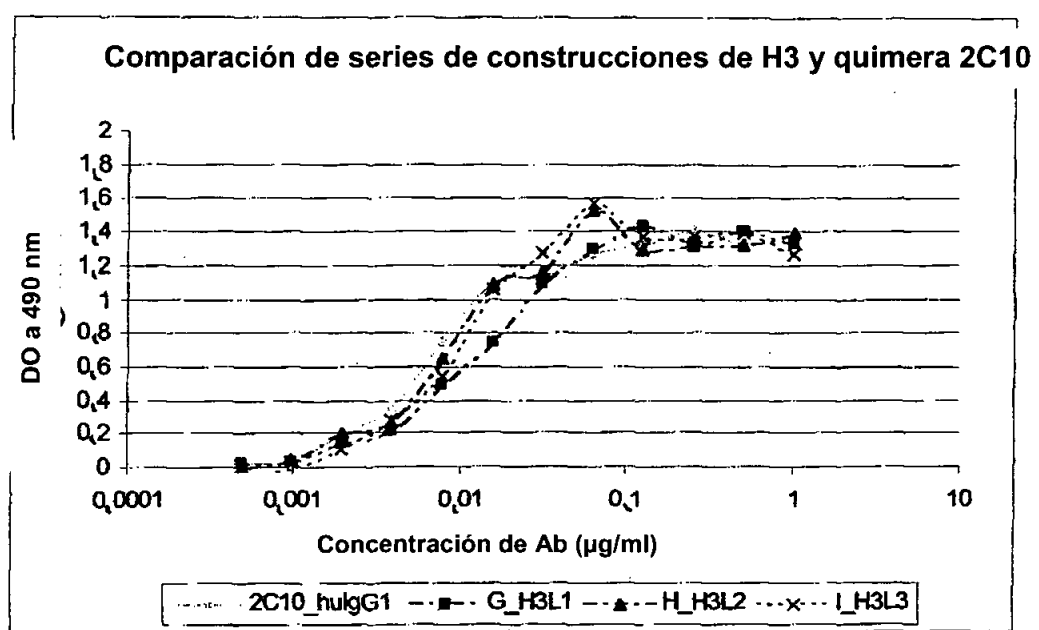
Figura 4C

Figura 5.

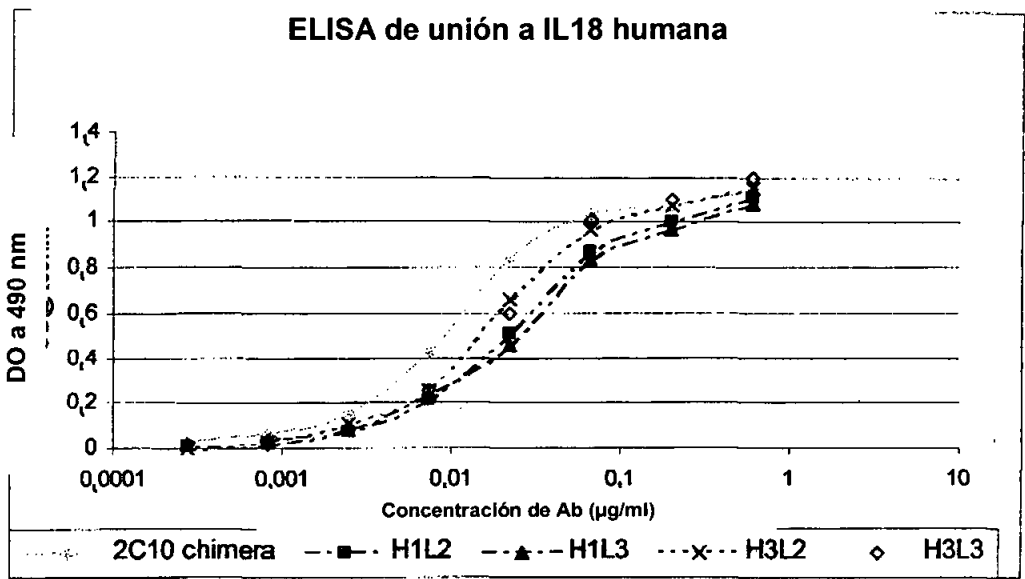


Figura 6.

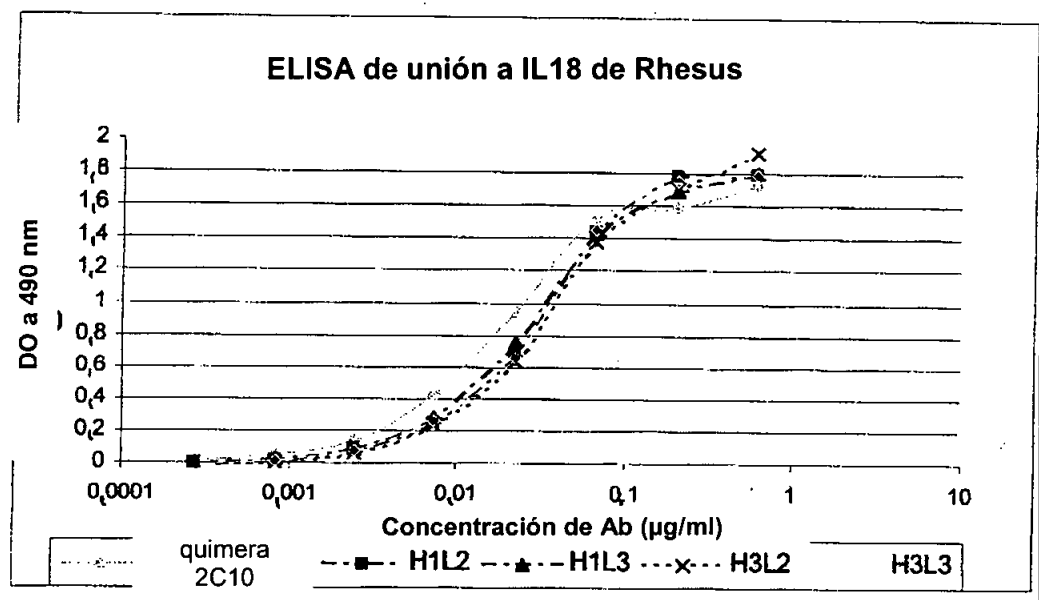


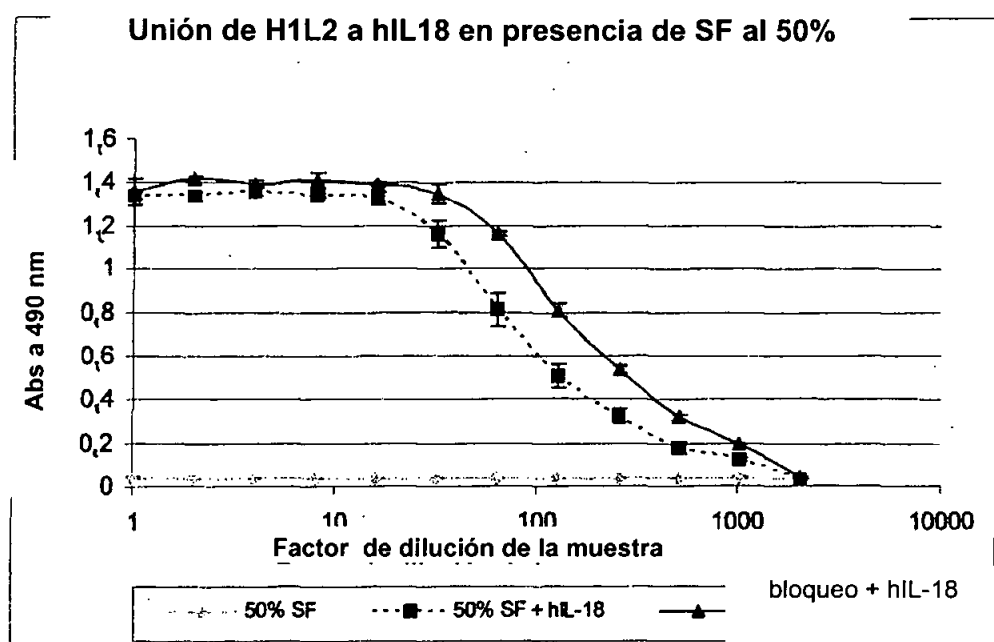
Figura 7.

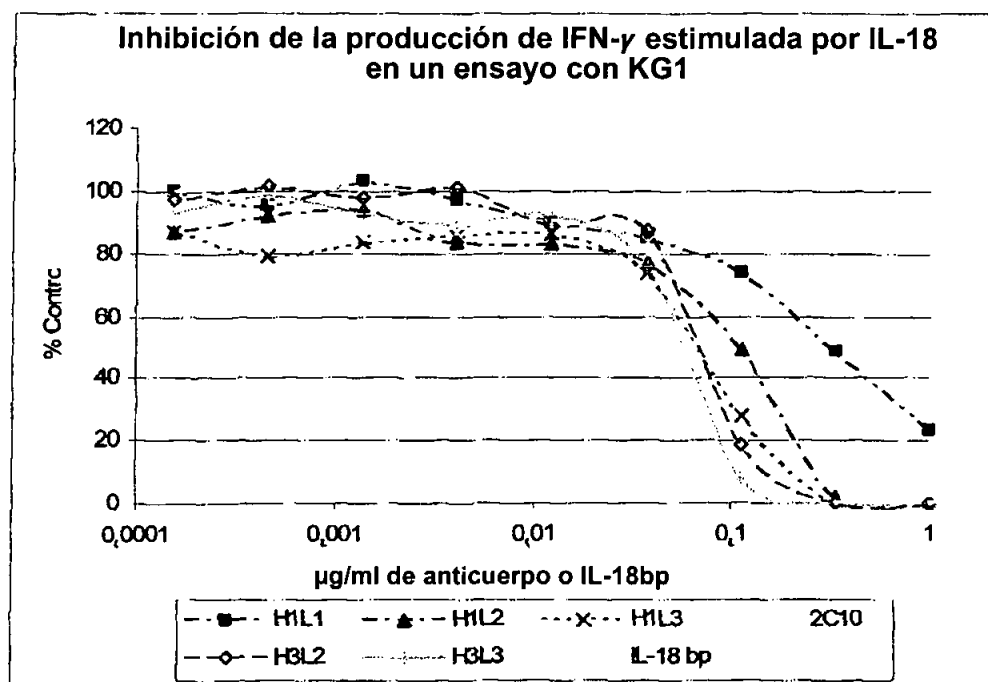
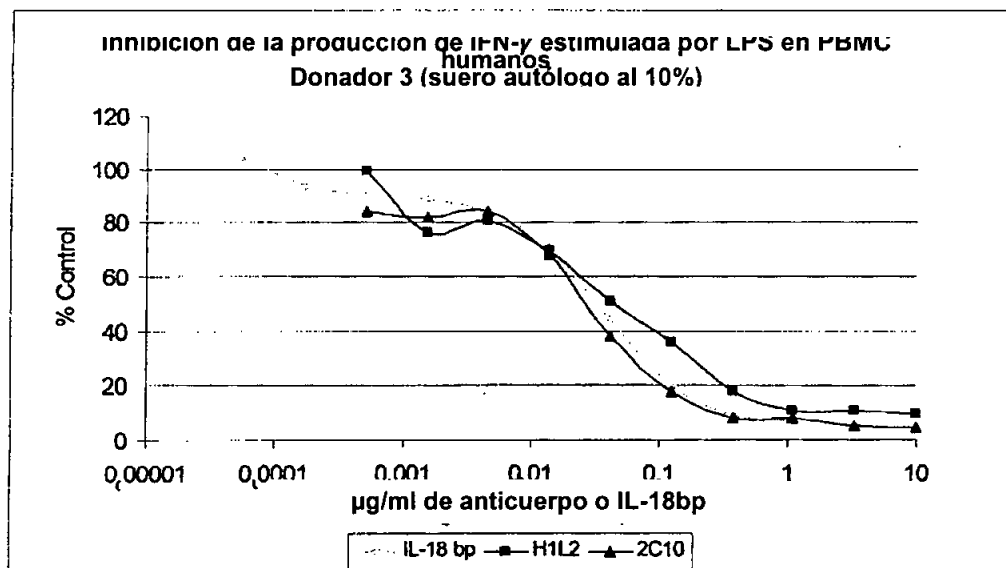
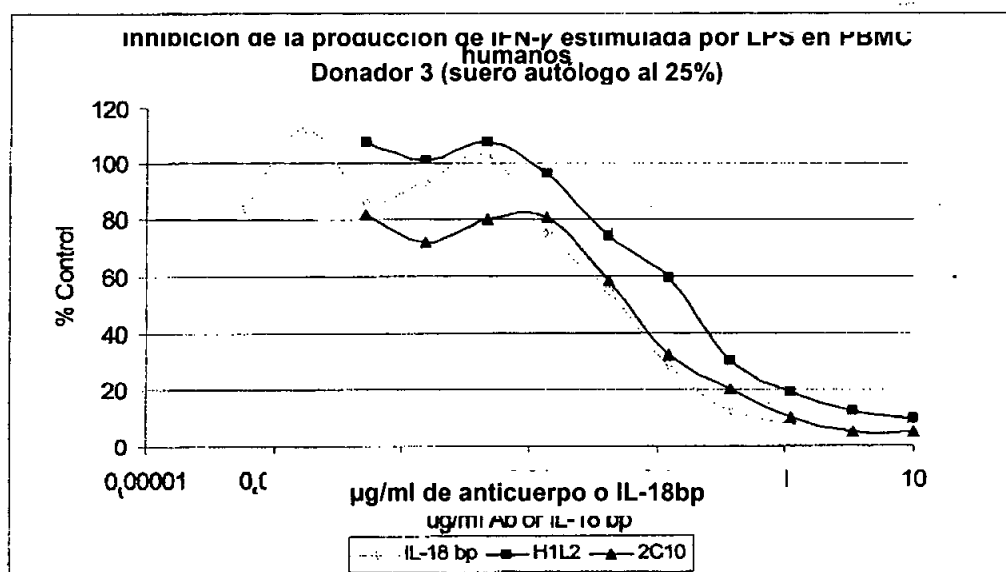
Figura 8.

Figura 9.

A

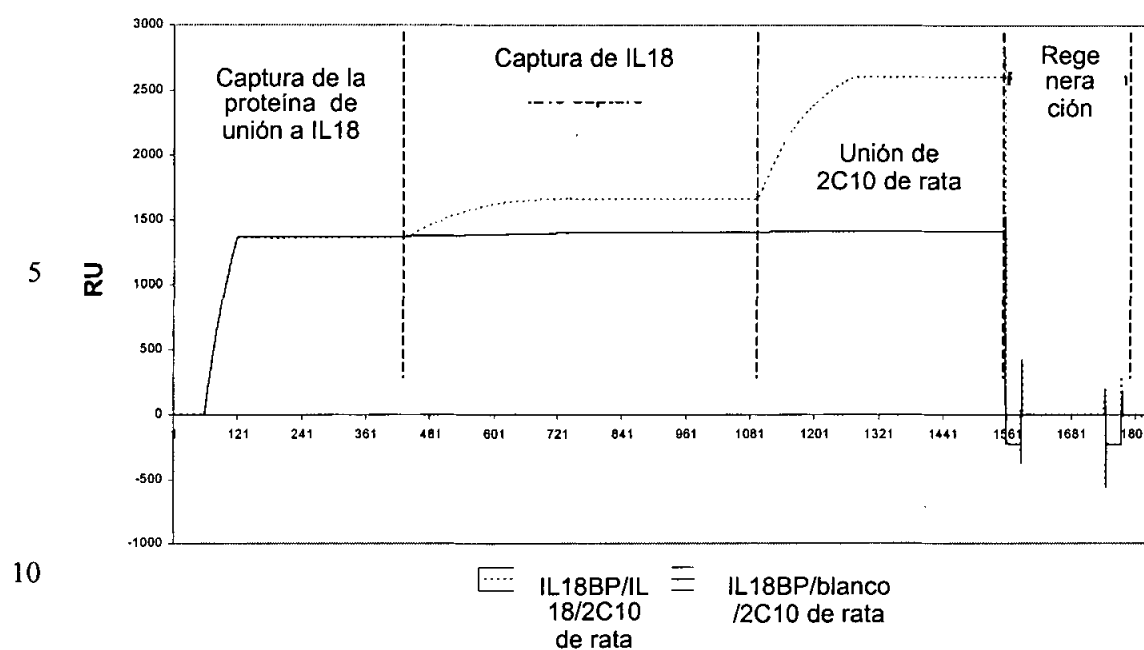


B



155

Figura 10.



15

156

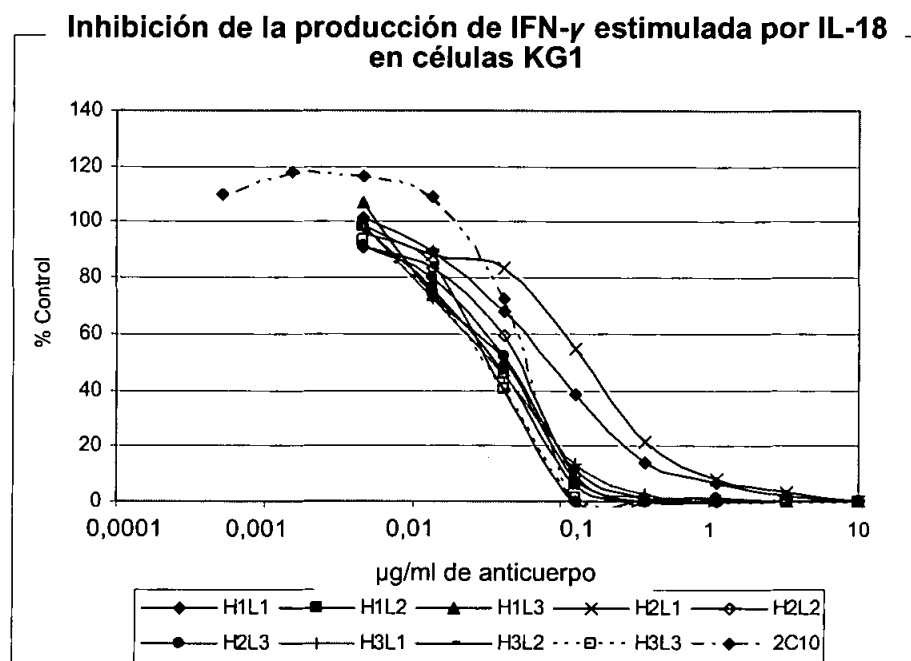
Figura 11.

Figura 12.

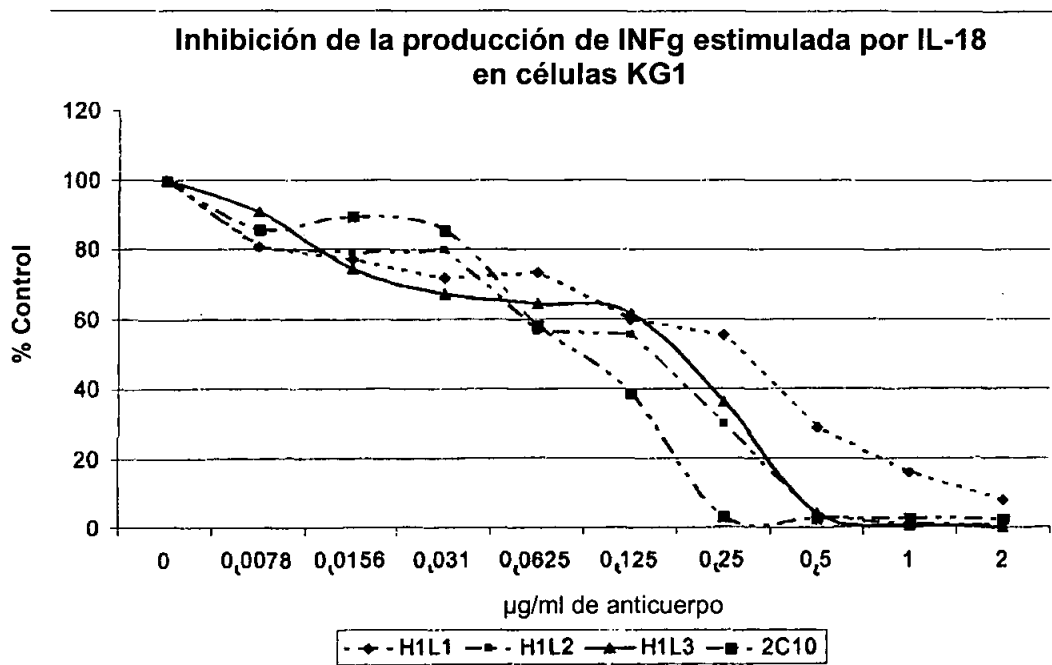


Figura 13 - Valores de CI50 ($\mu\text{g/ml}$) para cada anticuerpo monoclonal con un intervalo de confianza del 95%

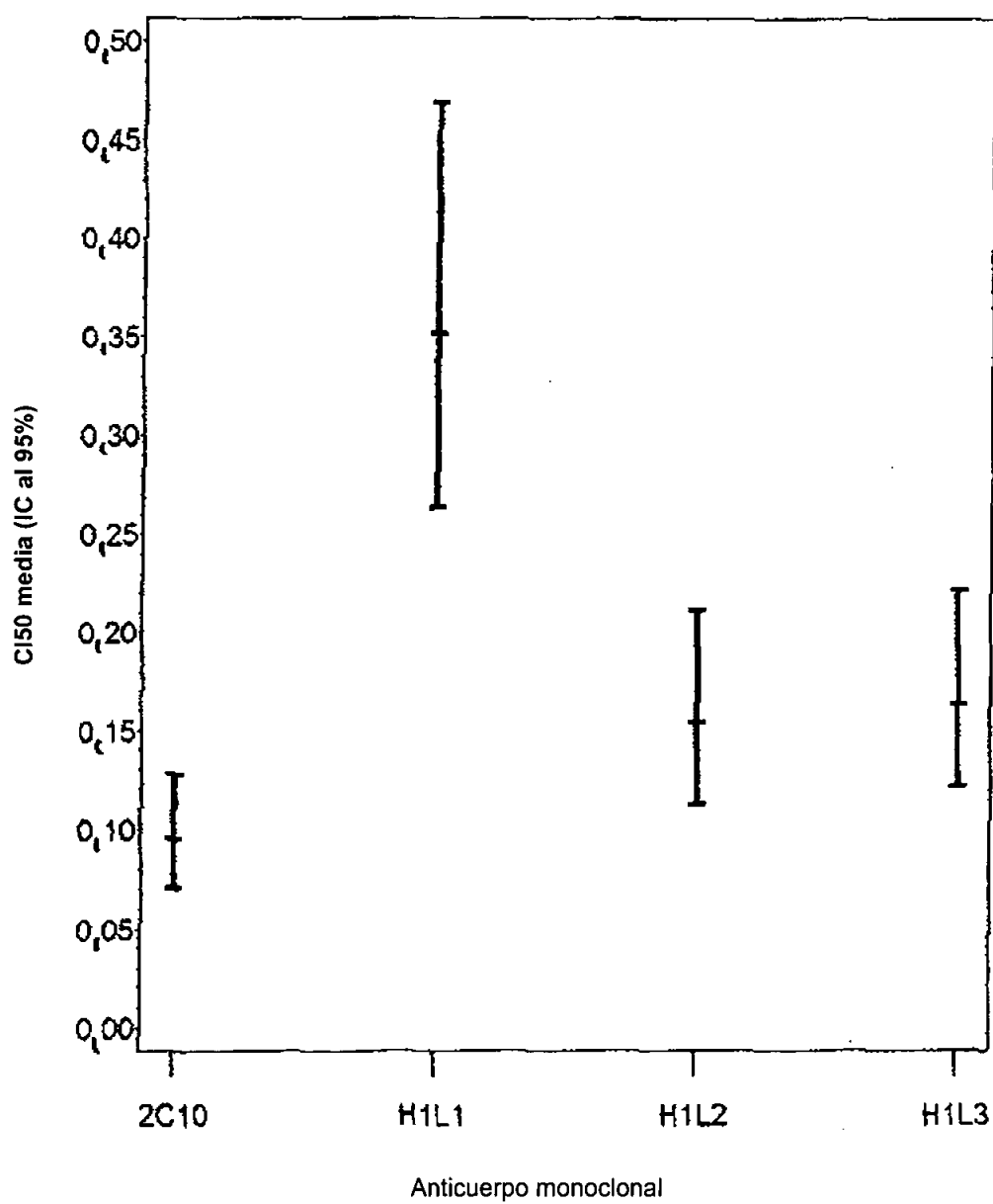


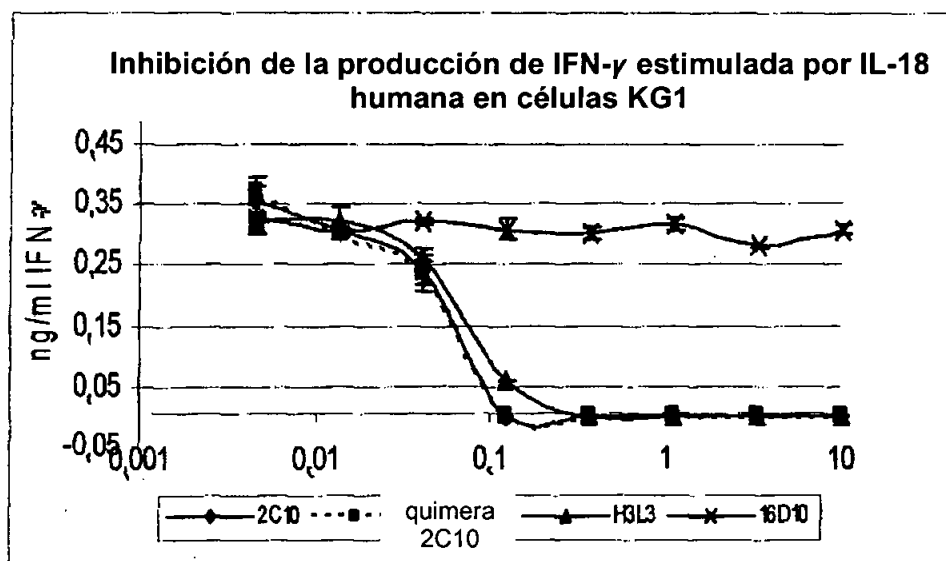
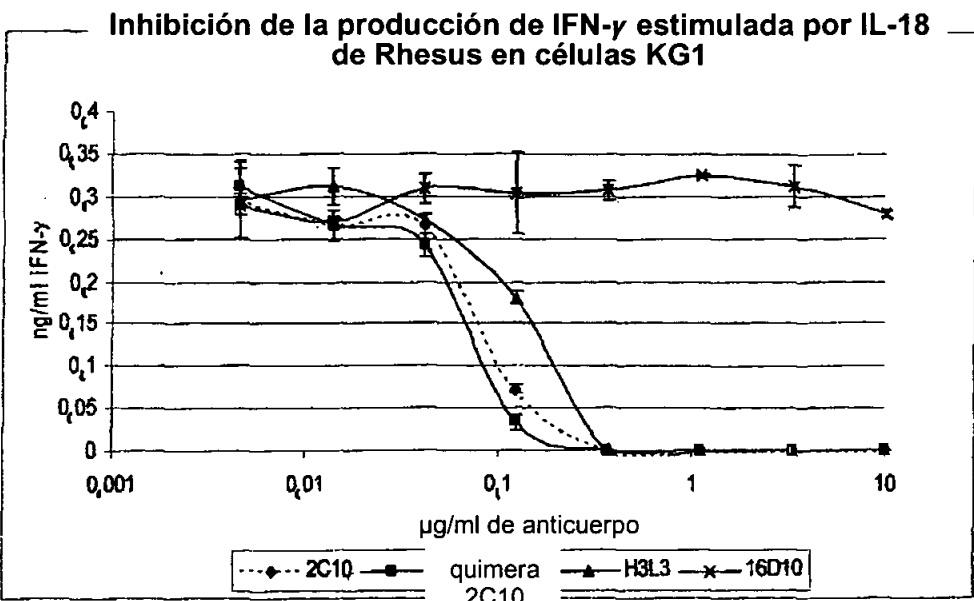
Figura 14.

Figura 15.



5

10

15

1161

Figura 16.

5

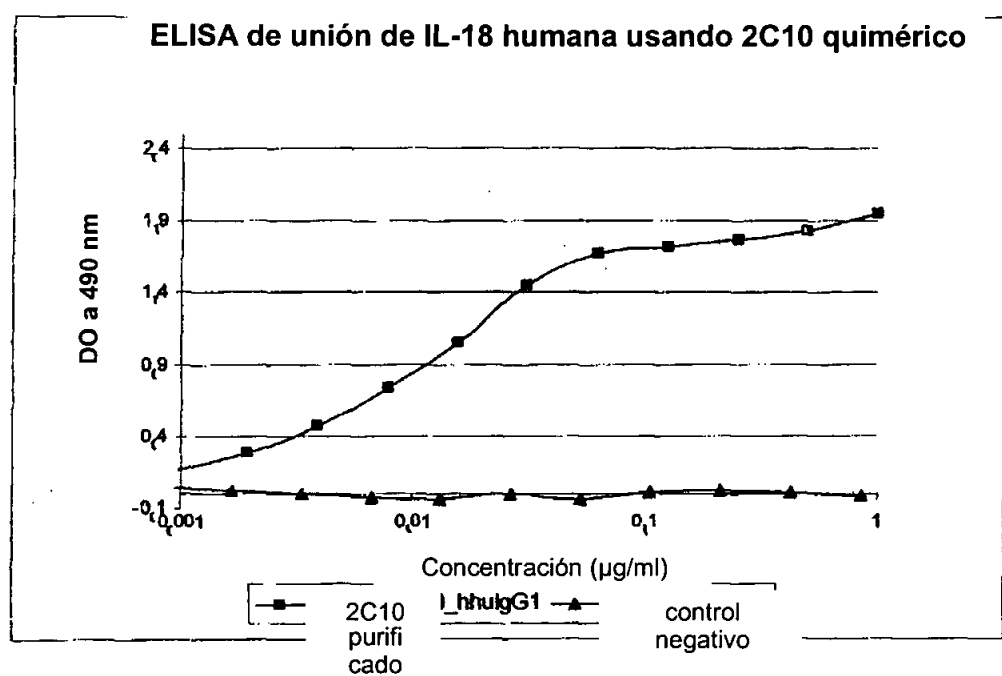


Figura 17.

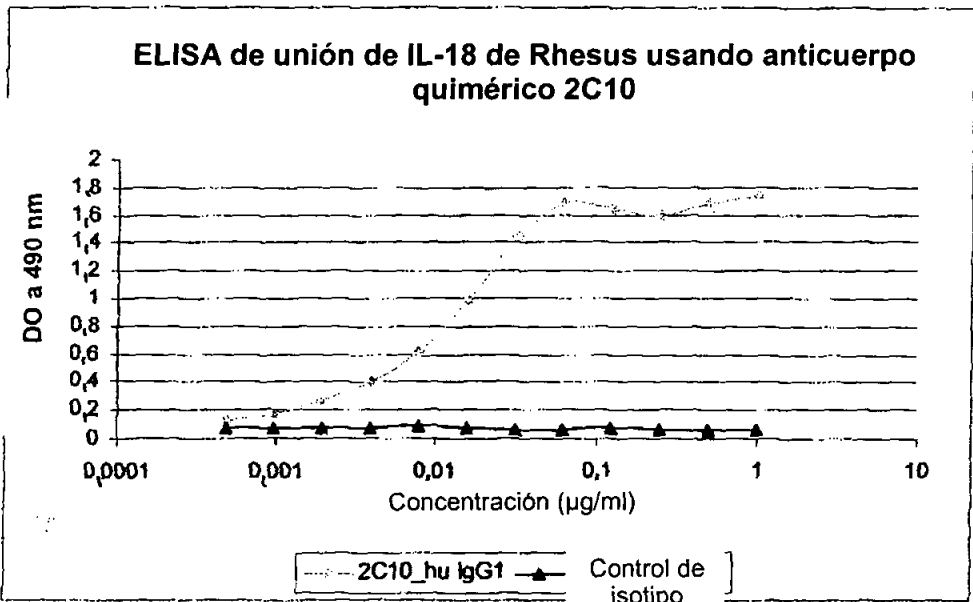
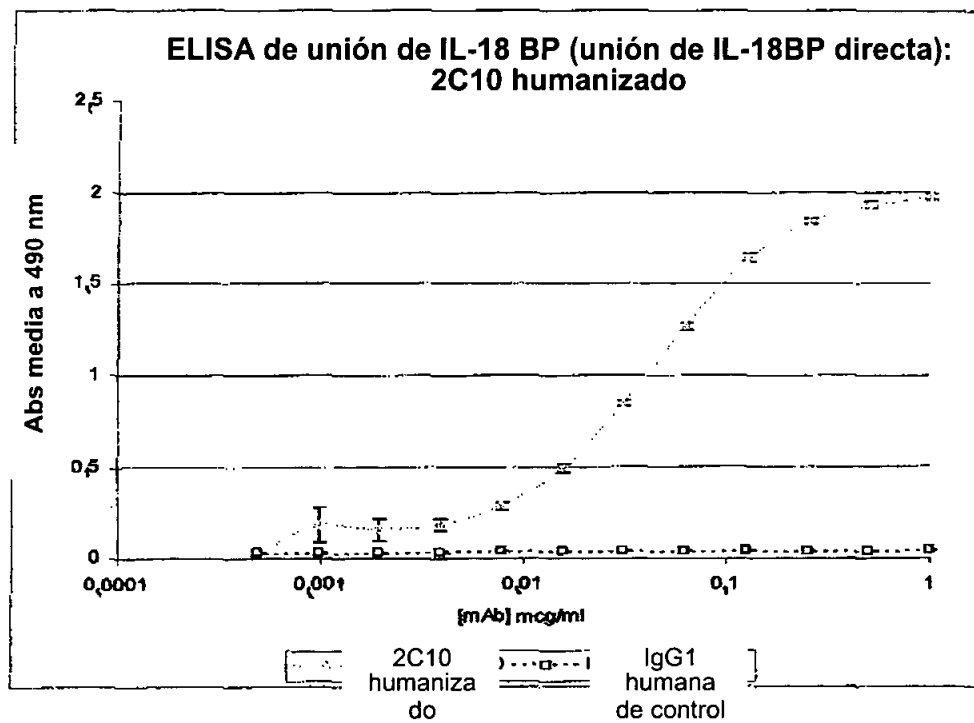
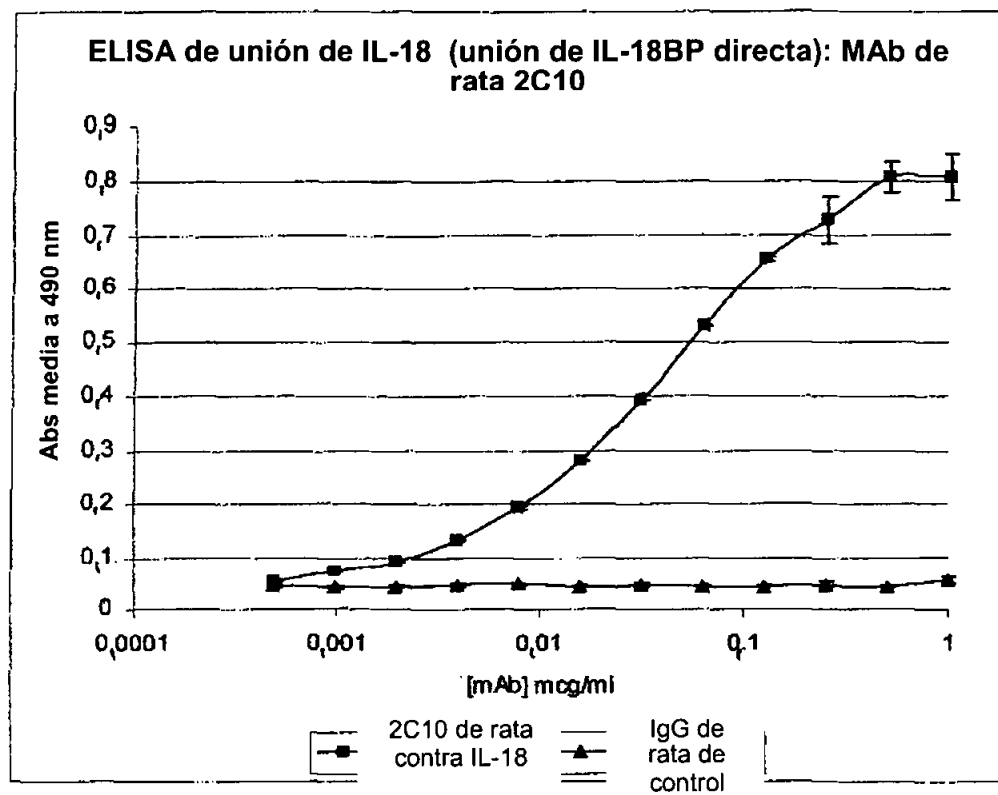


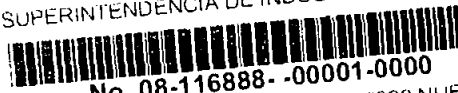
Figura 18A y 18B**A**

5

164

B

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-116888- -00001-0000

Fecha: 2008-12-16 16:09:09 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 5

www.lloredacamacho.com
jlcco@lloredacamacho.com

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-GLAXO GROUP LIMITED.-Solicitud de Patente de Invención en
Fase Nacional PCT para "ANTICUERPOS CONTRA
INTERLEUQUINA-18 HUMANIZADOS MODIFICADOS".-Clase
C07K 16/24.-Expediente número 08-116.888.-

1. Me refiero a mi solicitud de patente radicada ante ese Despacho el 31 de Octubre de 2008.
2. Atentamente me permito presentar a ese Despacho el documento que acredita el traspaso, que los autores de la patente de la referencia hacen a favor de mi representado, de los derechos sobre la misma, debidamente apostillado, junto con la Traducción Oficial número 2008-11-13-848, legalizada hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el número 944265, de 13 de Noviembre de 2008.
3. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-11-13-848
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Certificado Notarial, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

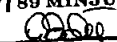
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

Certificado

5. en Londres
6. el 06 de agosto de 2007
7. por el Secretario Principal de Estado de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **H481153**
9. Sello/Estampilla:
Sello de la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth
10. Firma: (ilegible)
A. Cox
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177 / 89 MINJUSTICIA

NITA ESCOBAR DETAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2008 NOV 13 A 11:25

944265

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Anita Benayides
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

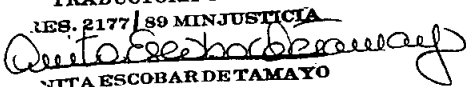
RECIBO LEGALIZACION 7/2

No. 811/3111653286

correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traspaso de la invención llamada "Inmunoglobulinas", documento escrito en inglés y en español.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 13 de noviembre de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Yo, el infrascrito, **James Kerr MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE la Cesión en sus versiones inglesa y española que se adjunta fue firmada por:

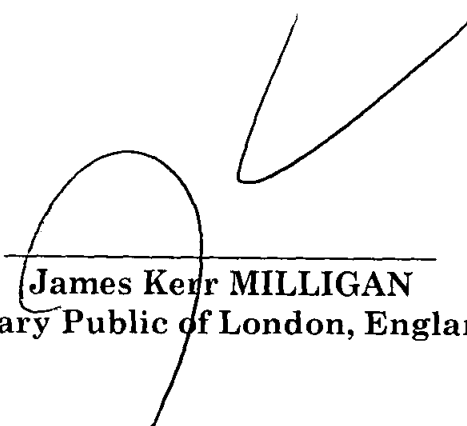
Don **Jonathan Henry Welbore ELLIS**, de nacionalidad británica, titular del pasaporte vigente número **028550784** expedido por la Agencia de Pasaportes del Reino Unido el 19 de agosto de 1997;

Don **Volker GERMASCHEWSKI**, de nacionalidad alemana, titular del Documento de Identidad vigente número **6047123838**, el cual caduca el 28 de agosto de 2011;

Don **Paul Andrew HAMBLIN**, de nacionalidad británica, titular del pasaporte vigente número **103922478** expedido por la Agencia de Pasaportes del Reino Unido el 7 de noviembre de 2002; y

Don **Ian Thomas KIRBY**, de nacionalidad británica, titular del pasaporte vigente número **032527980** expedido por la Agencia de Pasaportes del Reino Unido el 14 de agosto de 1998.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario, expido la presente que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy tres de agosto del año dos mil siete.


James Kerr MILLIGAN
Notary Public of London, England



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **James Kerr Milligan**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
6. the/le **06 August 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H481153**

9. Stamp
timbre

10. Signature: **A. Cox**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it shall be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille authentication certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT	CESION
Jonathan Henry ELLIS, Volker GERMASCHEWSKI, Paul Andrew HAMBLIN and Ian KIRBY By means of this document assign to Glaxo Group Limited A company organized under the laws of United Kingdom Domiciled in Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN, United Kingdom (hereinafter referred to as the ASSIGNEE). All my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in: Immunoglobulins So far as the Republic of Colombia is concerned. Place and date: <i>STEVENAGE, 9 July 07</i>  Jonathan Henry ELLIS Place and date: <i>Stevenage, UK 9/7/07.</i>  Paul Andrew HAMBLIN	Jonathan Henry ELLIS, Volker GERMASCHEWSKI Paul Andrew HAMBLIN y Ian KIRBY por medio de la present cedo (cedemos) a GLAXO GROUP Limited una <u>sociedad</u> organizada baja las leyes del Reino Unido domiciliada en GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY AVENUE, GREENFORD, MIDDLESEX UB6 0NN, REINO UNIDO (de ahora en adelante el CESIONARIO), todos mis (nuestros) derechos, titulo e interes sobre mi (nuestra) invencion tal como describe en: IMMUNOGLOBULINAS En lo que concierne a la Republica de Colombia. Place and date: <i>Stevenage, UK 09/07/07</i>  Volker GERMASCHEWSKI Place and date: <i>Stevenage 11/7/07 UK.</i>  Ian KIRBY

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-116888- -00000-0000

Fecha: 2008-10-31 16:26:49 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE(IYI) Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 165



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 34
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 146
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

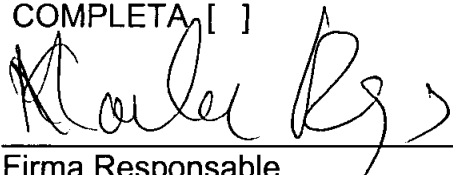
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha 31 OCT / 08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 172

2020
Bogotá D.C.,

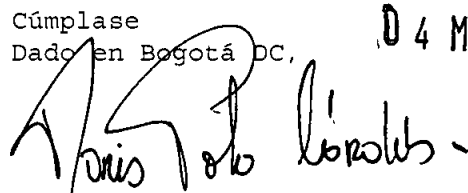
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	8 116888
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/055029
	Fecha inicio fase nacional	25/12/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	7658
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

04 MAR. 2009


DORIS ELENA POLO CORDOBA
Jefe de la división de Nuevas Creaciones (E)

jfernand