

TRADUZIONE

Brevetto Europeo n° EP 2928923

Domanda di Brevetto Europeo n° 13814340.9

Depositata in data 10 dicembre 2013

5

**Titolo: "ANTICORPI ANTI-ANTIGENE 2 DELLE CELLULE
DENDRITICHE DEL SANGUE E LORO USI"**

**Titolare: Biogen MA Inc., con sede in 225 Binney Street Cambridge, MA
02142 / USA**

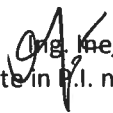
10

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

L'antigene 2 delle cellule dendritiche del sangue (BDCA2) è una lectina di tipo C espressa su cellule dendritiche plasmacitoidi umane (pDC) [Dzionic et al., J. Immunol., 165: 6037-6046 (2000)], una popolazione specializzata di cellule derivate dal midollo osseo che secernono interferoni di tipo I (IFN) in risposta a ligandi del recettore toll-simili (TLR). BDCA2 è costituito da un singolo dominio extracellulare di riconoscimento dei carboidrati (CRD), che appartiene al gruppo di lectina di tipo C di tipo II, in corrispondenza del suo terminale C, una regione transmembrana e una coda citoplasmatica corta in corrispondenza del suo terminale N che non ospita un motivo di segnalazione. BDCA2 trasmette segnali intracellulari attraverso un adattatore transmembrana associato, il FcεR1γ, e induce una cascata di segnalazione simile al recettore delle cellule B (BCR).

25 WO 01/036487 fornisce frammenti leganti l'antigene specifici per BDCA-


Ing. Mes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

2.

Sommario

La presente descrizione si basa, almeno in parte, sull'identificazione e la caratterizzazione di anticorpi che si legano a BDCA2. Tali anticorpi possono ridurre o inibire la secrezione di citochine infiammatorie e chemochine. Gli anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente contesto sono anche in grado di impoverire le pDC mediante citotossicità cellulare anticorpale (ADCC) o citotossicità mediata dal complemento (CDC). Inoltre, gli anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente contesto possono sottoregolare i livelli di CD32a e/o CD62L sulla superficie delle pDC. Inoltre, gli anticorpi anti-BDCA2 della presente descrizione possono mediare l'internalizzazione di BDCA2 dalla superficie cellulare delle pDC. Per almeno questi motivi, gli anticorpi anti-BDCA2 qui descritti sono utili nel trattamento o nella prevenzione di condizioni autoimmuni e infiammatorie. La presente descrizione mostra anche che gli anticorpi anti-BDCA2 qui descritti possono essere combinati con un agente antimalarico per effetti migliorati.

Sulla base della descrizione contenuta nel presente contesto, la presente invenzione fornisce un anticorpo isolato che lega l'antigene 2 delle cellule dendritiche del sangue umano (BDCA2) (SEQ ID NO: 1) in cui l'anticorpo comprende un dominio di catena pesante (VH) che è identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e in cui l'anticorpo comprende un dominio di catena leggera variabile (VL) che è identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23.

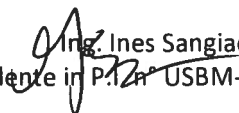
La presente invenzione fornisce anche un frammento legante l'antigene isolato che lega l'antigene 2 delle cellule dendritiche del sangue umano


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(BDCA2) SEQ ID NO: 1) in cui il frammento legante l'antigene comprende un dominio di catena pesante (VH) che è identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e in cui il frammento legante l'antigene comprende un dominio di catena leggera variabile (VL) che è identico alla sequenza amminoacidica di
5 SEQ ID NO:23.

La presente invenzione e le sue forme di realizzazione preferite sono esposte nelle rivendicazioni allegate.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato o il suo frammento legante l'antigene opzionalmente comprende ulteriormente o è costituito da
10 uno, due, tre, quattro o cinque, delle seguenti caratteristiche: un EC₅₀ (BDCA2 umano) da 0,5 a 3 µg/mL o da 4 nM a 10 nM; un EC₅₀ (cinomolgo BDCA2) da 0,5 a 3 µg/mL o da 5 nM a 10 nM; un pI da 7 a 7,5; non lega il Clec4b2 di ratto, né lega il Clec4b2 di ratto con un'affinità di legame inferiore rispetto a quella umana, BDCA2 di cinomolgo o rhesus; inibisce la produzione o la secrezione di
15 chemochine come MIP-1-α/CCL3, MIP-1β/CCL4, CCL5/RANTES, IP-10/CXCL10. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato o il frammento legante l'antigene ha un EC₅₀ (BDCA2 umano) di 4,5 nM, 4,6 nM, 4,7 nM, 4,8 nM, 4,9 nM, 5,0 nM, 5,1 nM, 5,2 nM, 5,3 nM, 5,4 nM, o 5,5 nM. In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo isolato o il frammento legante l'antigene ha
20 un EC₅₀ (BDCA2 umano) di 4,9 nM. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato o il frammento legante l'antigene ha un EC₅₀ (BDCA2 di cinomolgo) di 4,0 nM, 4,1 nM, 4,2 nM, 4,3 nM, 4,4 nM, 4,5 nM, 4,6 nM, 4,7 nM, 4,8 nM, 4,9 nM, o 5,0 nM. In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo isolato o il frammento legante l'antigene ha un EC₅₀ (BDCA2 di cinomolgo) di
25 4,4 nM. In alcune forme di realizzazione del presente aspetto, l'anticorpo ha


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

una regione costante di catena leggera e di catena pesante umana. In determinate forme di realizzazione, la regione costante di catena pesante comprende un dominio CH1 e una regione di cerniera. In alcune forme di realizzazione, la regione di costante di catena pesante comprende un dominio

5 CH3. Se la regione della costante di catena pesante include sostituzioni, tali sostituzioni modificano le proprietà dell'anticorpo (ad esempio, aumentano o diminuiscono uno o più tra: legame del recettore Fc, glicosilazione anticorpale, numero dei residui di cisteina, funzione delle cellule effettrici o funzione del complemento). In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo

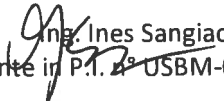
10 IgG. In forme di realizzazione specifiche, l'anticorpo è selezionato dal gruppo costituito da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 da 7 a 15 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 di 10

15 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 di 11 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 di 12 µg/mL.

Questi anticorpi (i) legano BDCA2 umano o di macaco cinomolgo ma non

20 legano significativamente BDCA2 da specie filogenetiche al di sotto dei primati; e/o (ii) inibiscono l'interferenza di tipo I indotta da TLR7/TLR9 e altre produzioni di citochine o chemochine da parte di pDC umane; e/o (iii) mediano l'interiorizzazione di BDCA2 dalla superficie delle pDC; e/o (iv) sottoregolano CD32a e/o CD62L dalla superficie delle pDC; e/o (v) esauriscono le pDC

25 mediante ADCC o CDC. In determinate forme di realizzazione del presente


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

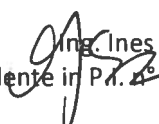
aspetto, l'anticorpo ha una regione costante di catena leggera e di catena pesante umana.

In determinate forme di realizzazione degli aspetti precedenti, l'anticorpo ha una catena pesante umana e una regione costante di catena leggera. In determinate forme di realizzazione, la regione costante di catena pesante comprende un dominio CH1 e una regione di cerniera. In alcune forme di realizzazione, la regione di costante di catena pesante comprende un dominio CH3. Se la regione della costante di catena pesante include sostituzioni, tali sostituzioni modificano le proprietà dell'anticorpo (ad esempio, aumentano o diminuiscono uno o più tra: legame del recettore Fc, glicosilazione anticorpale, numero dei residui di cisteina, funzione delle cellule effettrici o funzione del complemento). In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo IgG. In forme di realizzazione specifiche, l'anticorpo è selezionato dal gruppo costituito da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 da 7 a 15 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 di 10 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 di 11 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγRIIa (CD32a) con un EC50 di 12 µg/mL.

In determinate forme di realizzazione, la catena pesante comprende o è costituita dalla sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 4. In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene comprende o è costituito da una catena pesante che comprende o è

costituita dalla sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 4 e una catena leggera che comprende o è costituita dalla sequenza amminoacidica stabilita in SEQ ID NO: 3. Queste forme di realizzazione si riferiscono a tutti gli aspetti precedenti e alle loro forme di realizzazione. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo monoclonale. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo a catena singola. In altre forme di realizzazione, l'anticorpo o il frammento legante l'antigene è un frammento F_{ab} , un frammento $F_{(ab)2}$, un frammento $F_{ab'}$, un frammento F_{sc} , un frammento F_v , uno scFv, uno sc $(Fv)_2$ o un diabody. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG1.


In tutti i suddetti aspetti, l'anticorpo o il suo frammento di legame dell'antigene ulteriormente: (i) inibisce la secrezione di interferoni di tipo I e/o interferoni di tipo III oltre ad altre citochine e chemochine da cellule dendritiche plasmocitoidi; o (ii) induce o migliora l'esaurimento delle cellule dendritiche plasmocitoidi in vitro. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo sottoregola CD32a e/o CD62L su una pDC (rispetto a una pDC che non viene messo a contatto con un anticorpo anti-BDCA2). In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo media l'internalizzazione di BDCA2 dalla superficie delle pDC. In alcune forme di realizzazione degli aspetti precedenti, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene si lega al BDCA2 di cinomolgo (SEQ ID NO: 72) e al BDCA2 di rhesus (SEQ ID NO: 72). In determinate forme di realizzazione dei suddetti aspetti, l'anticorpo isolato o il suo frammento legante


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

l'antigene inibisce la secrezione o la produzione di interferone di tipo I, interleuchina-6 (IL-6), fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), interferone di tipo III, proteina-1 infiammatoria dei macrofagi (MIP-1)- α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, ligando 5 delle chemochine (motivo C-C) (CCL5/RANTES) o proteina-10 indotta da interferone γ (IP-10/CXCL10). In determinate forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo umanizzato. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo monoclonale. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo a catena singola. In altre forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo o il frammento legante l'antigene è un frammento F_{ab} , un frammento $F_{(ab) 2}$, un frammento $F_{ab'}$, un frammento F_{sc} , un frammento F_v , uno scFv, uno sc $(Fv)_2$ o un diabody. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG1. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG2. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG4. In alcune forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo è un ibrido delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4.

In determinate forme di realizzazione, la descrizione fornisce una cellula isolata che produce uno qualsiasi degli anticorpi sopra descritti o frammenti leganti l'antigene.

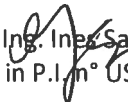
In altre forme di realizzazione, la descrizione fornisce una composizione farmaceutica comprendente uno qualsiasi degli anticorpi o frammenti leganti


Ing. Aless Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

l'antigene sopra descritti e un veicolo farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende uno qualsiasi degli anticorpi sopra descritti o suoi frammenti leganti l'antigene formulati in una composizione comprendente 10-25 mM di citrato, 100-200 mM di cloruro di sodio e un pH di 5,5-6,5. In determinate forme di realizzazione la composizione farmaceutica include opzionalmente Tween-80 (dallo 0,01 allo 0,3%, ad esempio 0,03%). In ancora altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende uno qualsiasi degli anticorpi sopra descritti o suoi frammenti leganti l'antigene formulati in una composizione comprendente 20 mM di citrato di sodio, 150 mM di cloruro di sodio e un pH di 6,0.

In un altro aspetto, la descrizione fornisce un metodo per produrre un anticorpo anti-BDCA2. Il metodo prevede fornire una cellula comprendente una catena pesante e/o una catena leggera dell'anticorpo BDCA2, incubare la cellula in condizioni che consentano l'espressione dell'anticorpo e l'isolamento dell'anticorpo. Il metodo opzionalmente comprende la purificazione dell'anticorpo. In determinate forme di realizzazione, la cellula è una cellula CHO. In altre forme di realizzazione, la cellula è una cellula 293. In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo anti-BDCA2 è B1B059. In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene ha una catena pesante e una catena leggera, in cui la catena pesante comprende o è costituita dalla sequenza stabilita in SEQ ID NO: 4, e la catena leggera comprende o è costituita dalla sequenza indicata in SEQ ID NO: 3.

In un altro caso, la descrizione fornisce un metodo per rilevare la presenza di una cellula dendritica plasmocitoide in un tessuto. Il metodo comprende mettere a contatto i tessuti con un anticorpo anti-BDCA2. In


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da lupus eritematoso sistemico. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da sclerodermia. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da morfea. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da artrite reumatoide. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da psoriasi. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da dermatomiosite. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da polimiosite. In determinati casi, il tessuto è una biopsia cutanea di un soggetto affetto da malattia infiammatoria intestinale. In casi specifici, il lupus eritematoso sistemico è il lupus cutaneo, il lupus discoide o la nefrite da lupus. L'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene possono essere marcati, ad esempio, con un fluoroforo (ad esempio, Alexa Fluor 647). In determinati casi, l'anticorpo anti-BDCA2 è B1IB059. In altri casi, l'anticorpo anti-BDCA2 è il clone 124B3.13 (dendritici). In determinati casi, il metodo comprende inoltre il contatto con il tessuto con un anticorpo anti-CD 123.

In un altro caso, la descrizione fornisce un metodo per indurre la morte di una cellula dendritica plasmocitoide in un soggetto che ne ha bisogno. Il metodo prevede somministrare al soggetto o mettere a contatto una cellula dendritica plasmocitoide che esprime BDCA2 con uno qualsiasi degli anticorpi o dei suoi frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto.

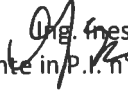
In un altro caso, la descrizione presenta un metodo per ridurre la produzione di citochine o chemochine infiammatorie da parte di una cellula dendritica plasmocitoide in un soggetto che ne ha bisogno. Il metodo comprende somministrare al soggetto o mettere a contatto una cellula

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.V. n° USBM-041R

dendritica plasmocitoidoide che esprime BDCA2 con una quantità efficace di uno qualsiasi degli anticorpi o dei suoi frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto. In determinati casi, le citochine o le chemochine infiammatorie sono selezionate dal gruppo costituito da: interferone di tipo I, IL-6 o TNF- α , interferone di tipo III, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, CCL5/RANTES, e IP-10/CXCL10.

In un altro caso, la descrizione presenta un metodo di sottoregolazione dell'espressione di CD32a sulla superficie di una cellula dendritica plasmocitidica. Il metodo comprende mettere a contatto la cellula dendritica plasmocitoidoide con un anticorpo anti-BDCA2 descritto nel presente contesto. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG1. In alcuni casi, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG2. In alcuni casi, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG4. In alcuni casi, l'anticorpo è un ibrido delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4. In determinati casi, l'anticorpo è aglicosilato. In casi specifici, l'anticorpo è un ibrido aglicosilato delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4.

In un altro caso, la descrizione presenta un metodo di sottoregolazione dell'espressione di CD32a (Fc γ R1a) sulla superficie di una cellula dendritica plasmocitidica in un soggetto umano che ne ha bisogno. Il metodo comprende la somministrazione al soggetto umano di una quantità efficace di un anticorpo anti-BDCA2 descritto nel presente contesto. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 ha una regione costante di catena pesante IgG1. In alcuni casi, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG2. In alcuni casi, l'anticorpo ha una regione costante di catena


Ing. Francesco Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

pesante IgG4. In alcuni casi, l'anticorpo è un ibrido delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4. In determinati casi, l'anticorpo è aglicosilato. In un caso specifico, l'anticorpo è un ibrido aglicosilato delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4.

5 In un altro caso, la descrizione presenta un metodo per inibire la stimolazione di una cellula dendritica plasmocitoide da parte di complessi immunitari in un soggetto umano che ne ha bisogno. Il metodo comprende la somministrazione al soggetto umano di una quantità efficace di un anticorpo anti-BDCA2 descritto nel presente contesto. In alcuni casi, la somministrazione
10 riduce il livello di CD32a sulla superficie delle pDC. In alcuni casi, il soggetto è affetto da ipersensibilità di tipo III. In un caso, il soggetto umano è affetto da LES. In un altro caso, il soggetto umano è affetto da artrite reumatoide. In ancora un altro caso, il soggetto è affetto dalla sindrome di Sjögren. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo ha una regione costante di
15 catena pesante IgG1. In alcuni casi, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG2. In alcuni casi, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG4. In alcuni casi, l'anticorpo è un ibrido delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4.

In un altro caso, la descrizione presenta un metodo di sottoregolazione
20 dell'espressione (o spargimento) di CD62L (L-selectina) sulla superficie di una cellula dendritica plasmocitidica in un soggetto umano che ne ha bisogno. Il metodo comprende la somministrazione al soggetto umano di una quantità efficace di un anticorpo anti-BDCA2 o il frammento legante l'antigene descritto nel presente contesto. In casi specifici, la somministrazione dell'anticorpo anti-
25 BDCA2 o del frammento legante l'antigene aumenta il livello di una o più

metalloproteinasi. In determinati casi, la sottoregolazione di CD62L si verifica attraverso la scissione da parte di una metalloproteinasi. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG1. In alcuni casi, degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo ha una regione costante di
5 catena pesante IgG2. In alcuni casi degli aspetti di cui sopra, l'anticorpo ha una regione costante di catena pesante IgG4. In alcuni casi, tra i cinque aspetti di cui sopra, l'anticorpo è un ibrido delle regioni costanti di catena pesante IgG1 e IgG4.

In un ulteriore aspetto, la descrizione presenta uno qualsiasi degli
10 anticorpi sopra descritti o suoi frammenti leganti l'antigene per l'uso in un metodo di trattamento di un disturbo infiammatorio in un soggetto che ne ha bisogno. Il metodo prevede la somministrazione al soggetto che ne ha bisogno di una quantità efficace di uno qualsiasi degli anticorpi anti-BDCA2 o dei suoi frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto. In alcune forme di
15 realizzazione, il disturbo infiammatorio è selezionato dal gruppo costituito da lupus eritematoso sistemico (LES), lupus cutaneo, lupus discoide, nefrite lupica, artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale, sclerosi sistemica, morfea, psoriasi, diabete di tipo I, dermatomiosite, polimiosite e morbo di Sjogren. In una forma di realizzazione specifica, il disturbo infiammatorio è LES. In un'altra
20 forma di realizzazione specifica, il disturbo infiammatorio è il lupus discoide. In ancora un'altra forma di realizzazione specifica, il disturbo infiammatorio è la nefrite lupica. In un'altra forma di realizzazione specifica, il disturbo infiammatorio è il lupus cutaneo. In determinate forme di realizzazione, il soggetto è affetto da LES generale. In determinate forme di realizzazione, il
25 soggetto è affetto da LES moderato. In determinate forme di realizzazione, il

ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USPM-041R

soggetto è affetto da LES moderato senza grave coinvolgimento renale attivo e/o del SNC attivo grave. In determinate forme di realizzazione, il soggetto è affetto da LES moderato con con grave coinvolgimento renale attivo e/o del SNC grave attivo. In determinate forme di realizzazione, il soggetto ha

5 manifestazioni cutanee di LES (ad esempio rash malare o discoide). In determinate forme di realizzazione, il soggetto è affetto da LES grave. In determinate forme di realizzazione, il soggetto è affetto da LES grave senza grave coinvolgimento renale attivo e/o del SNC attivo grave. In determinate

10 forme di realizzazione, il soggetto è affetto da LES grave con grave coinvolgimento renale attivo e/o del SNC attivo grave. Il lupus moderato o grave è una stadiazione del lupus (si veda, ad esempio, Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults, Arthritis & Rheumatism, 42(9):1785-1795 (1999); Gladman, Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus, Curr. Opin. Rheumatol., 8: 430-437 (1996);

15 Kalunian et al., Definition, classification, activity and damage indices. In: Dubois' lupus erythematosus. 5a edizione, Baltimora: Williams e Wilkins; pp. 19-30 (1997)].

In un altro aspetto, la descrizione presenta uno qualsiasi degli anticorpi sopra descritti o suoi frammenti leganti l'antigene per l'uso in un metodo di

20 trattamento di una patologia autoimmune in un soggetto che ne ha bisogno. Il metodo prevede la somministrazione al soggetto che ne ha bisogno di una quantità efficace di uno qualsiasi degli anticorpi anti-BDCA2 o dei suoi frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto.

In uno qualsiasi degli aspetti precedenti relativi ai metodi, in alcune forme

25 di realizzazione, il soggetto è un essere umano. In uno qualsiasi degli aspetti

Ing. Yves Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

precedenti relativi ai metodi, in alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 o il frammento di legame dell'antigene viene somministrato in combinazione con almeno uno tra: un antimalarico (ad esempio, idrossiclorochina), un inibitore di segnalazione TLR7, un inibitore di segnalazione TLR9 o un corticosteroide. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 comprende inoltre una regione Fc che si lega a CD32a con un EC50 da almeno circa 7 a 15 µg/mL (ad esempio, 10, 11, 12 µg/mL). In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo anti-BDCA2 è BIIB059.

In un altro aspetto, la descrizione presenta una combinazione comprendente un antimalarico (ad esempio idrossiclorochina) e l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento di legame dell'antigene. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 comprende inoltre una regione Fc che si lega a CD32a con un EC50 da almeno circa 7 a 15 µg/mL (ad esempio, 9, 10, 11, 12, 13, 14 µg/mL). In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo anti-BDCA2 è BIIB059.

In un altro aspetto, la divulgazione presenta una combinazione comprendente un inibitore di segnalazione TLR7 e/o TLR9 e il suo anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento di legame dell'antigene. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 comprende inoltre una regione Fc che si lega a CD32a con un EC50 da almeno circa 7 a 15 µg/mL (ad esempio, 10, 11, 12 µg/mL). In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo anti-BDCA2 è BIIB059.

In un ulteriore aspetto, la descrizione presenta una combinazione comprendente un corticosteroide e l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2

Ing. Ives Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 245BM-041R

comprende inoltre una regione Fc che si lega a CD32a con un EC50 da almeno circa 7 a 15 µg/mL (ad esempio, 9, 10, 11, 12, 13, 14 µg/mL). In una forma di realizzazione specifica, l'anticorpo anti-BDCA2 è B1B059.

Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati nel presente contesto hanno lo stesso significato comunemente compreso dall'esperto della tecnica con competenza ordinaria alla quale appartiene la presente invenzione. Sebbene metodi e materiali simili o equivalenti a quelli descritti nel presente contesto possano essere utilizzati nella pratica o nella prova della presente invenzione, di seguito sono descritti materiali e metodi
10 esemplificativi. In caso di conflitto, prevarrà la presente domanda di brevetto, incluse le definizioni. I materiali, i metodi e gli esempi sono soltanto illustrativi e non sono intesi a essere limitativi.

Altre caratteristiche e vantaggi dell'invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni.

15 **Breve descrizione dei disegni**

La FIG. 1 è una rappresentazione schematica della segnalazione di BDCA2 in una cellula dendritica plasmocitidica [si veda Geijtenbeek et al., Nature Reviews Immunology, 9: 465-479 (2009)].

La FIG. 2 è un grafico che mostra le varianti hu24F4 Hx/L1 che si legano al
20 BDCA2 umano.

La FIG. 3 è un grafico che mostra le varianti hu24F4 Hx/L1 che si legano al BDCA2 di cinomolgo.

La FIG. 4 è una mappa schematica del plasmide pJP009 che codifica la catena leggera anti-BDCA2. La sequenza di acido nucleico anti-BDCA2 a catena
25 leggera è sotto controllo trascrizionale del promotore di IE hCMV e delle

sequenze di poliadenilazione di hGH. Il gene per la fosfotransferasi amminoglicosidica (resistenza alla neomicina) è sotto controllo trascrizionale del promotore della fosfoglicerina chinasi murina (muPGK) e delle sequenze di poliadenilazione. Le sequenze rimanenti, incluso il gene per la beta-lattamasi, sono per la propagazione e la selezione in *E. coli*.

La FIG. 5 è una mappa schematica del plasmide pJP010 che codifica la catena pesante anti-BDCA2. La sequenza di acido nucleico di catena pesante anti-BDCA2 è sotto controllo trascrizionale del promotore di hCMV IE e delle sequenze di poliadenilazione di hGH nella crescita umana. Il gene della diidrofolato reduttasi (dhfr) è sotto controllo trascrizionale del promotore SV40E e delle sequenze di poliadenilazione. Le sequenze rimanenti, incluso il gene per la beta-lattamasi, sono per la propagazione e la selezione in *E. coli*.

La FIG. 6 è un grafico a linee che mostra il legame di BIIB059 sulle cellule dendritiche del plasmacitoide umano (B) e del cinomolgo (A). Il sangue intero di macaco cinomologo (A) o umano (B) è stato incubato con diverse concentrazioni di anticorpo (cerchi) BIIB059 marcato con Alexa647 o un isotipo di IgG umano (quadrati) su ghiaccio. I dati sono stati acquisiti utilizzando la macchina FACS a colori LSRII-4 e analizzati utilizzando il software FlowJo e GraphPad Prism.

La FIG. 7 è un grafico a linee che mostra i risultati di un test AlphaScreen per l'autoassociazione. Legenda: diamante = BIIB059; quadrato = 5c8; e triangolo = LT105.

La FIG. 8 è un grafico a linee che mostra i risultati di una fluorometria a scansione differenziale per testare la stabilità di BIIB059 in condizioni diverse. Questo grafico mostra i dati con 150 mM di cloruro di sodio e 250 mM di

saccarosio in funzione del pH.

La FIG. 9 è un grafico a linee che mostra l'effetto dell'agitazione sull'aggregazione nel tempo. L'aggregazione è stata soppressa con l'aggiunta di Tween 80.

5 **La FIG. 10** è un grafico a linee che mostra l'associazione diretta di AC144 alla superficie umana e BDCA2 di cinomolgo.

La FIG. 11 è una serie di grafici che mostrano i risultati dell'analisi cromatografica di esclusione dimensionale delle proteine di fusione Fc.

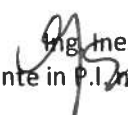
10 **La FIG. 12** è un grafico che mostra l'effetto del calcio sul legame di BIIB059 con BDCA2. Il legame BIIB059 con BDCA2 è potenziato dall'aggiunta di calcio rispetto all'EDTA che fornisce un segnale circa 2 volte più alto.

La FIG. 13 è un grafico che mostra i risultati del legame con l'ottetto di BIIB059 agli ectodomini BDCA2 di macaco cinomolgo e umani

15 **La FIG. 14** è un grafico che mostra che BIIB059 inibisce potentemente l'IFN α da PBMC stimulate con l'agonista TLR9. Ogni simbolo rappresenta l'IC₅₀ di un esperimento indipendente e le linee verticali rappresentano il SEM.

Le FIGG. 15A-C forniscono una serie di grafici che mostrano che BIIB059 inibisce potentemente le citochine e le chemochine dal sangue intero stimulate con il ligando TLR9. **La Fig. 15A** mostra l'inibizione dell'IFN α usando sangue venoso eparinizzato da donatori sani. **La Fig. 15B** mostra l'inibizione dell'IFN α usando sangue intero da due pazienti affetti da LES (pannelli superiori) rispetto ai risultati usando sangue intero da 2 donatori sani (pannelli inferiori). **La Figura 15C** fornisce una serie di grafici a barre che mostrano che il trattamento con BIIB059 ha portato all'inibizione di una vasta gamma di citochine e chemochine.

25 **La FIG. 16** è un grafico a barre che mostra che BIIB059 inibisce l'espressione


Ing. mes Sangiacomo
Consulente in P.I. 12 USBM-041R

dell'interferone di tipo I.

La FIG. 17 include due grafici a linee che mostrano che il legame di BDCA2 con BIIIB059 inibisce la produzione di citochine indotte da TLR9 in pDC purificati.

La FIG. 18 è un grafico a barre che mostra che il legame di BDCA2 sopprime
5 l'induzione della produzione di IFN- α nelle pDC stimulate dal siero LES.

La FIG. 19A è un grafico a linee che mostra che BDCA2 è interiorizzato dopo il legame con BIIIB059. **La FIG. 19B** è un grafico a linee che mostra che l'internalizzazione non influisce sull'inibizione mediata da BIIIB059 della produzione di IFN- α .

10 **La FIG. 20** è una serie di grafici a linee che mostrano il legame di BIIIB059 con i recettori Fc γ .

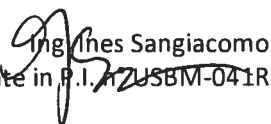
La FIG. 21 fornisce i risultati dell'ELISA C1q che mostra il legame del C1q umano a concentrazioni crescenti (0-15 μ g/mL) di anticorpo rivestito.

Le FIGG. 22A-D sono una serie di grafici che mostrano che BIIIB059 media
15 l'uccisione cellulare attraverso ADCC. La linea cellulare CHO (EAG2456 T1F2 Clone 34.16.7) è stata utilizzata come cellula bersaglio. Il livello di espressione di BDCA2 sulla superficie delle cellule CHO è stato determinato mediante FACS utilizzando un mAb anti-BDCA2 marcato APC (clone AC144, Miltenyi). Le cellule NK sono state utilizzate come cellule effettrici. L'ADCC è stato
20 valutato utilizzando il kit del saggio di citotossicità Vybrant (Invitrogen), seguendo le istruzioni del produttore. Il saggio rileva G6PD da cellule danneggiate in base alla riduzione di resazurina G6PD-dipendente che emette fluorescenza a 590 nm dopo eccitazione a 530 nm. Il saggio ADCC rappresentato nella **FIG.22A** è stato eseguito usando cellule CHO ad alta
25 espressione di BDCA2 (**FIG.22C**) mentre il saggio ADCC nella **FIG.22B** ha

usato cellule CHO con un'espressione di BDCA2 inferiore (**FIG.22D**).

La **FIG. 23** è un grafico a linee che mostra che BIIB059 media l'uccisione cellulare attraverso il CDC. Le cellule CHO (EAG2456 T1F2 Clone 34.16.7) sono state seminate in 5×10^4 cellule in piastre nere di pozzetto da 96 pozzetti di collagene e incubate a 37°C per 48 ore. Le piastre sono state quindi lavate e incubate con complemento di siero di coniglio e ioduro di propidio (PI) in presenza di mAb anti-BDCA2 competenti effettori (24F4S e BIIB059), mAb privi di funzione effettrice (24F4S-Agly e 24F4A-Agly) o controllo isotipico IgG1 per 1h a 37°C . Il controllo negativo consisteva in pozzetti contenenti cellule CHO, 5
10 complemento sierico di coniglio, PI, senza anticorpi.

La **FIG. 24** è una serie di grafici utilizzati per determinare l'EC50 del legame BIIB059 ("diretto") e competitivo BIIB059-A647 ("indiretto") su pDC di macaco cinomolgo. Prima dell'iniezione *in vivo* di BIIB059, il sangue veniva prelevato da dodici macachi cinomolghi una volta alla settimana per un totale di tre 15 settimane. La citofluorimetria è stata utilizzata per determinare l'EC50 del BIIB059 che si lega al BDCA2 sulla superficie cellulare della pDC (metodo "diretto") e la quantità di recettore BDCA2 disponibile in presenza del BIIB059 (metodo "indiretto"). Il sangue è stato incubato con una titolazione a sei punti di BIIB059 a un intervallo di $40-0,04 \mu\text{g/mL}$. Le pDC sono state identificate 20 mediante citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR + e trattati con una secondaria IgG anti-umana marcata PE o BIIB059-A647 marcato con $10 \mu\text{g/mL}$. L'MFI di PE (simboli aperti, rappresentati graficamente sull'asse y sinistro) o A647 (simboli chiusi, rappresentati graficamente sull'asse y destro) è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente utilizzando il 25 software Prisma GraphPad (adattamento curva di regressione non lineare a


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. #2158M-041R


quattro parametri di dati trasformati in log). In questa sede sono mostrati i grafici rappresentativi di quattro dei dodici macachi cinomolghi.

La FIG. 25 è un grafico rappresentativo che presenta il legame plateau dell'anticorpo anti-BDCA2 B1B059 alla superficie cellulare BDCA2 su pDC nel sangue intero di macaco cinomolgo. Il sangue è stato incubato con una titolazione a sei punti di B1B059 a un intervallo di 40-0,04 µg/mL. Le pDC sono stiate identificate mediante citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR + e trattate con una secondaria IgG anti-umana marcata PE. L'MFI di PE è stata calcolata nel software FlowJo ed è stata calcolata la percentuale di associazione massima, utilizzando il punto 40 µg/mL come 100%. Ogni riga rappresenta una singola scimmia cynomolgus, per un totale di dodici macachi cinomolghi, e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism (adattamento della curva di regressione non lineare a quattro parametri di dati trasformati in log). La colorazione è stata ripetuta una volta alla settimana per un totale di tre settimane. Le linee tratteggiate dimostrano che una concentrazione di 10 µg/mL di B1B059 satura il legame del recettore BDCA2 per tutti i macachi cinomolghi.

Le FIGG. 26A-C si riferiscono ai livelli di B1B059 legato e la colorazione BDCA2 libera su macachi cinomolghi trattati con veicoli. La FIG. 26A è una serie di istogrammi FACS che mostrano la colorazione di fondo PE su macachi cinomolghi trattati con veicoli. Ai macachi cinomolghi 1, 4 e 12 è stata somministrata una singola iniezione IV di controllo del veicolo (citrato di sodio) al tempo 0. Dopo 1 ora, è stato prelevato sangue intero e le pDC sono stati identificate mediante citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR + e trattate con PE IgG anti-umano (istogrammi aperti) o tampone FACS come

controllo a fluorescenza PE meno uno (FMO) (istogrammi solidi). **La FIG. 26B** è un grafico della colorazione PE su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi con veicolo nei punti temporali indicati. La MFI di PE è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism. **La FIG. 26C** è un grafico della colorazione A647 su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con veicolo nei punti temporali indicati. BIIB059-A647 a 10 µg/mL è stato addizionato ai prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con veicolo in ciascuno dei punti temporali indicati e testati per la colorazione A647 su pDC. La MFI di A647 è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism.


Le FIGG. 27A-C mostrano che il recettore BIIB059 e BDCA2 legato non è più disponibile sulla superficie cellulare del pDC dopo una singola dose di BIIB059 10 mg/kg nel macaco cinomolgo. **La FIG. 27A** è una serie di istogrammi FACS che mostrano la colorazione BIIB059 sui macachi cinomolghi trattati con 10 mg/kg di BIIB059. Ai macachi cinomolghi 3, 8 e 10 è stata somministrata una singola iniezione IV di BIIB059 a 10 mg/kg al tempo 0. Dopo 1 ora, è stato prelevato sangue intero e le pDC sono state identificate come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR + e trattati con PE IgG anti-umano (istogrammi aperti) o tampone FACS come controllo PE FMO (istogrammi solidi). **La FIG. 27B** è un grafico della colorazione PE su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 nei punti temporali indicati. La MFI di PE è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism. **La FIG. 27C** è un grafico della colorazione A647 su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 nei punti

Ing.  P. Sangiacomo
Consulente in P. n. USBM-041R

temporali indicati. BIIB059-A647 a 10 µg/mL è stato addizionato ai prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 in ciascuno dei punti temporali indicati e testati per la colorazione A647 su pDC. La MFI di A647 è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism.

Le FIGG. 28A-C mostrano che il recettore BIIB059 e BDCA2 legato non è più disponibile sulla superficie cellulare della pDC dopo una singola dose di BIIB059 da 1 mg/kg nel macaco cinomolgo. **La FIG. 28A** è una serie di istogrammi FACS che mostrano la colorazione BIIB059 sui macachi cinomolghi trattati con 1 mg/kg di BIIB059. Ai macachi cinomolghi 3, 8 e 10 è stata somministrata una singola iniezione IV di BIIB059 a 1 mg/kg al tempo 0. Dopo 1 ora, è stato prelevato sangue intero e i pDC sono stati identificati come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR + e trattati con PE IgG anti-umano (istogrammi aperti) o tampone FACS come controllo PE FMO (istogrammi solidi). **La FIG. 28B** è un grafico della colorazione PE su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 nei punti temporali indicati. La MFI di PE è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism. **La FIG. 28C** è un grafico della colorazione A647 su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 nei punti temporali indicati. BIIB059-A647 a 10 µg/mL è stato addizionato ai prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 in ciascuno dei punti temporali indicati e testati per la colorazione A647 su pDC. La MFI di A647 è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism.

Le FIGG. 29A-C mostrano che il recettore BIIB059 e BDCA2 legato non è più


Ing. Anes Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

disponibile sulla superficie cellulare della pDC dopo una singola dose sottocutanea (SC) di BIIB059 da 0,2 mg/kg nel macaco cinomolgo. **La FIG. 29A** è una serie di istogrammi FACS che mostrano la colorazione BIIB059 sui macachi cinomolghi trattati con 0,2 mg/kg di BIIB059 SC. Ai macachi cinomolghi 4, 6 e 12 è stata somministrata una singola iniezione SC di BIIB059 a 0,2 mg/kg al tempo 0. Dopo 1 ora, è stato prelevato sangue intero e le pDC sono state identificate come CD20⁻CD14⁻CD123⁺HLA-DR⁺ e trattati con PE IgG anti-umano (istogrammi aperti) o tampone FACS come controllo PE FMO (istogrammi solidi). **La FIG. 29B** è un grafico della colorazione PE su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 nei punti temporali indicati. La MFI di PE è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism. **La FIG. 29C** è un grafico della colorazione A647 su pDC da prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 nei punti temporali indicati. BIIB059-A647 a 10 µg/mL è stato addizionato ai prelievi di sangue dai tre macachi cinomolghi trattati con BIIB059 in ciascuno dei punti temporali indicati e testati per la colorazione A647 su pDC. La MFI di A647 è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente con il software GraphPad Prism.

La FIG. 30 è una serie di grafici che mostrano le correlazioni PK/PD osservate per i macachi cinomolghi che hanno ricevuto BIIB059 IV da 1 mg/kg e i macachi cinomolghi che hanno ricevuto BIIB059 IV a 10 mg/kg. Per ogni grafico in questa figura, la concentrazione sierica di BIIB059 viene tracciata sull'asse y sinistro (simboli aperti) e la densità del recettore BDCA2 viene tracciata sull'asse y destro (simboli solidi). La clearance accelerata osservata nel macaco cinomolgo 5 era probabilmente dovuta all'immunogenicità a BIIB059.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

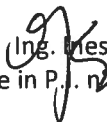
La FIG. 31 è una serie di grafici che mostrano le correlazioni PK/PD osservate per i macachi cinomolghi che hanno ricevuto BIIB059 SC da 0,2 mg/kg. Per ogni grafico in questa figura, la concentrazione sierica di BIIB059 viene tracciata sull'asse y sinistro (simboli aperti) e la densità del recettore BDCA2 viene tracciata sull'asse y destro (simboli solidi).

La FIG. 32 è una serie di grafici a barre che mostrano i risultati di saggi ELISA o multiplex per misurare le concentrazioni di citochine infiammatorie e chemochine prodotte da pDC trattati con CpG-A, CpG-A in presenza di anti-BDCA2 e CpG-A in presenza di controllo isotipico. Ogni barra rappresenta la deviazione media e standard (SD) per i pozzetti duplicati da un donatore umano sano rappresentativo su 5 testati. Le linee verticali rappresentano la SD.

La FIG. 33 è una serie di grafici a barre che mostrano i risultati dei test ELISA o multiplex per misurare le concentrazioni di citochine infiammatorie e chemochine prodotte da pDC trattati con complessi immunitari Sm/RNP, complessi immunitari Sm/RNP in presenza di anti-BDCA2 e Sm/RNP complessi immunitari in presenza di controllo isotipico. Ogni barra rappresenta la deviazione media e standard (SD) per i pozzetti duplicati da un donatore umano sano rappresentativo su 5 testati. Le linee verticali rappresentano la SD.

La FIG. 34 è una serie di grafici a barre che mostrano i risultati dei saggi qPCR per determinare l'effetto di BIIB059 sulla trascrizione dei sottotipi IFN di tipo I nelle pDC Sm/RNP stimolati con IC da donatori umani sani. Ogni barra rappresenta la variazione di ripiegamento relativa media per pozzetti quadruplicati da un donatore rappresentativo su 3 testati ($n = 3$) e le linee verticali rappresentano la deviazione standard (SD).

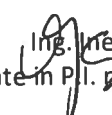
La FIG. 35A mostra l'inibizione dose-dipendente mediata da BIIB059 di IFN α

Ing.  Francesco Sangiacomo
Consulente in P. n. USBM-041R

indotta da TLR9 da PBMC da un donatore umano sano rappresentativo su 18 testati. Ogni simbolo rappresenta la media e la deviazione standard (SD) per i pozzetti duplicati. **La FIG. 35B** mostra l'inibizione dose-dipendente mediata da BII059 di IFN α indotta da TLR9 da PBMC da un paziente affetto da LES rappresentativo su 11 testati. Ogni simbolo rappresenta la media e la deviazione standard (SD) per i pozzetti duplicati. **La FIG. 35C** mostra i valori IC50 per l'inibizione di BII059 della produzione di IFN α indotta da TLR9 da PBMC in donatori umani sani (HD) rispetto ai pazienti affetti da LES (LES). Ogni simbolo rappresenta un singolo donatore e le linee verticali rappresentano la SD.

La FIG. 36A mostra l'inibizione dose-dipendente mediata da BII059 di IFN α indotta da TLR9 da un saggio di sangue intero rappresentativo su 12 testati. Ogni simbolo rappresenta la media e la deviazione standard (SD) per i pozzetti duplicati. **La FIG. 36B** mostra i valori IC50 per l'inibizione di BII059 della produzione IFN α indotta da TLR9 nei saggi del sangue intero rispetto ai saggi di PBMC. Ogni simbolo rappresenta un singolo donatore e le linee verticali rappresentano la SD.

La FIG. 37 mostra PBMC di donatori umani sani che sono state stimulate con 1 μ M del ligando TLR3 (Poly I:C) e trattati con concentrazioni di BII059 comprese tra 10 μ g/mL e 0,5 ng/mL in un volume di dosaggio totale di 250 μ L/pozzetto in una piastra da 96 pozzetti. Le piastre sono state incubate durante la notte (18 ore) a 37 °C e 5% di CO₂. 200 μ l di surnatanti sono stati raccolti per la valutazione dei livelli di IFN α mediante ELISA. Ogni simbolo rappresenta i livelli medi di IFN α prodotti in ciascuna condizione di trattamento. Vengono mostrati i dati di due donatori indipendenti. Le linee verticali indicano

Ing.  Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

la deviazione standard (SD).

La FIG. 38A mostra l'internalizzazione BDCA2 mediata dalla dose BIIB059 da un donatore umano sano rappresentativo. I cerchi rappresentano la MFI della colorazione 2D6 alle varie dosi di BIIB059. Il triangolo rappresenta l'MFI di 2D6 in presenza del controllo isotipico (massima colorazione). Il diamante rappresenta l'MFI del controllo FMO (colorazione di sfondo). La FIG. 38B mostra EC50 di interiorizzazione BDCA2 indotta da BIIB059 su pDC in saggi di sangue intero da donatori umani sani (cerchi chiusi; n = 10 donatori). L'EC50 medio era $0,017 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$.

La FIG. 39 è una rappresentazione grafica dei valori di intensità di fluorescenza media (MFI) della colorazione 2D6-FITC di CD14-CD20-HLA-DR + CD123 + pDC sottoposti a gating. L'isotipo (iso) rappresenta la colorazione massima, FMO (fluorescenza meno un controllo) consisteva nel cocktail di colorazione FACS meno 2D6-FITC rappresenta la colorazione di sfondo. In questa figura è mostrato un esperimento rappresentativo di 4 esperimenti indipendenti eseguiti.

La FIG. 40 sono immagini confocali di pDC umani purificati dal sangue periferico e quindi incubati con $10 \mu\text{g/mL}$ di BIIB059-AF647 (bianco) a 4°C (a sinistra) o a 37°C in 5% di CO_2 (a destra) per 15 min. La distribuzione cellulare BIIB059 è stata valutata mediante microscopia confocale e viene mostrato un quadro rappresentativo per ciascuna condizione.

La FIG. 41 è una rappresentazione grafica dell'effetto dell'internalizzazione di BDCA2 sull'inibizione della produzione di $\text{IFN}\alpha$. Questa figura è una rappresentazione di 3 esperimenti indipendenti.

La FIG. 42 è una rappresentazione grafica che mostra che i valori EC50 dell'internalizzazione BDCA2 mediata da BIIB059 sono correlati con i valori IC50

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

di inibizione mediata da BIIB059 dell'IFN α indotta da TLR9 nei saggi di sangue intero (n = 10). Valore R2 di 0,57.

La FIG. 43A mostra i risultati espressi come media e deviazione standard (SD) dei coefficienti di colocalizzazione di Manders per la localizzazione TLR9 nel compartimento LAMP1+. La FIG. 43B mostra i risultati espressi come media e SD dei coefficienti di colocalizzazione di Manders per la localizzazione BIIB059/BDCA2 nel compartimento TLR9+. La FIG. 43C mostra i risultati espressi come media e SD dei coefficienti di colocalizzazione di Manders per la localizzazione BIIB059/BDCA2 nel compartimento LAMP1+. Ogni simbolo rappresenta una singola cellula; le linee orizzontali rappresentano la media, le linee verticali rappresentano la SD.


La FIG. 44A è un istogramma di un esperimento rappresentativo di sangue intero trattato con 10 μ g/mL di BIIB059 (istogramma colorato), controllo isotipo di 10 μ g/mL (linea tratteggiata) o sangue intero stimolato con il ligando TLR9, CpG-A (linea continua). La FIG. 44B è una rappresentazione grafica dell'effetto del trattamento con BIIB059 sul sangue intero provocato dallo spargimento di CD62L (quadrati chiusi). Il quadrato aperto rappresenta il trattamento isotipico (10 μ g/mL). Questa figura è rappresentativa di 3 esperimenti indipendenti.

La FIG. 45 è una rappresentazione grafica dell'espressione superficiale di CD62L è stata saggiata mediante citofluorimetria. L'espressione di CD62L è stata misurata in presenza del solo BIIB059 e con concentrazioni crescenti di GM6001 (cerchi). Il quadrato aperto rappresenta il controllo trattato con isotopi (10 μ g/mL). Il triangolo invertito rappresenta il controllo DMSO trattato con BIIB059. Questa figura è rappresentativa di 2 esperimenti indipendenti.

La FIG. 46A è una illustrazione grafica dell'interiorizzazione dose-dipendente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 1258M-041R

mediata da BIIB059 e 24F4A-Agly di BDCA2 sulla superficie delle pDC da un donatore umano sano rappresentativo (n = 5). Le pDC da donatori sani umani sono state isolate utilizzando una procedura di separazione magnetica in due fasi (kit MACS, Miltenyi Biotec). Le pDC sono state trattate con concentrazioni crescenti di BIIB059 (cerchi) o della forma a-glicosilata dell'anticorpo-24F4-Agly-(quadrati). Le cellule sono state inoltre trattate con 10 µg/mL di controllo isotipico (triangolo) e incubate per 16 ore a 37 °C. Le pDC sono state quindi colorate per l'espressione superficiale di BDCA2 e CD32. **La FIG. 46B** è un istogramma che mostra i livelli di CD32 su pDC isolati trattati con 10 µg/mL di BIIB059 (ombreggiato) o il controllo isotipico (punteggiato) (n = 5). **La FIG. 46C** è un istogramma che mostra i livelli di CD32 su pDC isolati trattati con 10 µg/mL di forma a-glicosilata-24F4-A (ombreggiato) o del controllo isotipico (punteggiato). La linea continua rappresenta le cellule non colorate (n = 5). **La FIG. 46D** è una rappresentazione grafica della sotto-modulazione dose-dipendente mediata da BIIB059 di CD32 sulla superficie delle pDC da un donatore umano sano rappresentativo (n = 5). **La FIG. 46E** è un istogramma che mostra i livelli di CD32 su pDC isolate trattate per 1 ora a 4 °C in presenza di 10 µg/mL di BIIB059 (ombreggiato), la forma a-glicosilata (tratteggiata) o un controllo isotipico (punteggiato). Dopo l'incubazione le pDC sono state valutate per l'espressione della superficie del CD32. La linea nera piena rappresenta cellule non colorate (n = 3). **La FIG. 46F** è un istogramma che mostra i livelli di CD32 su pDC isolati trattati per 1 ora a 37°C in presenza di 10 µg/mL di BIIB059 (ombreggiato), la forma a-glicosilata (tratteggiata) o un controllo isotipico (punteggiato). Dopo l'incubazione le pDC sono state valutate per l'espressione della superficie del CD32. La linea nera piena rappresenta cellule


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 40581-041R

non colorate (n = 3).

La FIG. 47A è una rappresentazione grafica dei livelli di IFN α da pDC isolate trattate con concentrazioni crescenti di BIIB059 (quadrati), concentrazioni crescenti della forma α -glicosilata dell'anticorpo 24F4-A (cerchi) o controllo dell'istotipo a 10 μ g/mL (triangolo). Le pDC sono state stimulate in presenza di CpG-A (75 μ g/mL) o lasciate non stimulate (triangolo invertito). Le pDC sono state incubate per 16 ore a 37 °C e i surnatanti sono stati raccolti e analizzati per l'IFN α mediante ELISA. Viene mostrato un esperimento rappresentativo su 2 condotto. La FIG. 47B è una rappresentazione grafica dei livelli di IFN α da pDC isolati trattati con concentrazioni crescenti di BIIB059 (quadrati), concentrazioni crescenti della forma α -glicosilata dell'anticorpo 24F4-A (cerchi), controllo dell'istotipo a 10 μ g/mL (triangolo), o CD32 mAb anti-umano a 10 μ g/mL. I complessi immunitari Sm/RNP (IC) sono stati preformati mescolando Sm-RNP da timo di vitello e anticorpi anti-RNP purificati da sieri di pazienti affetti da LES per 30 minuti in terreno privo di siero. Le cellule isolate sono state stimulate con complessi immunitari o trattate solo con l'antigene (non stimolato). Le cellule sono state incubate per 16 ore a 37 °C e i surnatanti sono stati raccolti e analizzati per l'IFN α mediante ELISA. Viene mostrata una figura rappresentativa su 3 condotte. Ogni simbolo rappresenta la media e la deviazione standard (SD) per i pozzetti duplicati.

La FIG. 48A è un grafico a barre che mostra l'espressione di CD32 su pDC isolati trattati con complessi immunitari in presenza di 10 μ g/mL di BIIB059, 24F4-A, anti-CD32 mAb (clone AT10), anticorpo anti-CD40 umanizzato o controllo isotipico. Le cellule sono state incubate per 16 ore a 37 °C. Le pDC sono state colorate per l'espressione superficiale di CD32 e CD40. La FIG. 48B

Ing. Ives Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

è un grafico a barre che raffigura i livelli di IFN α misurati da ELISA nei supernatanti raccolti da A. Viene mostrato un dato rappresentativo (n = 3). La FIG. 48C è un istogramma che mostra l'espressione CD40 sulla superficie delle pDC. La linea tratteggiata rappresenta l'espressione CD40 sulla superficie cellulare. L'istogramma colorato rappresenta i livelli di CD40 su pDC dopo il trattamento con anticorpo anti-CD40. La linea continua rappresenta cellule non macchiate.

La FIG. 49 illustra l'impatto di HCQ sulla potenza di BIIIB059. Ogni simbolo rappresenta le concentrazioni di IFN α misurate da un singolo donatore umano sano e le linee verticali rappresentano la SD. PBMC da donatori umani sani sono state trattate con concentrazioni variabili di BIIIB059 da solo, HCQ da solo o in combinazione (BIIIB059 + HCQ) in un volume di dosaggio totale di 250 μ L/pozzetto. Le concentrazioni di BIIIB059 variavano da 10 μ g/mL a 0,1 ng/mL. Le concentrazioni di HCQ variavano da 10 μ M a 156 nM. 1×10^6 cellule/pozzetto PBMC sono state stimolate con 5 μ M del ligando TLR7 (R848). Le piastre contenenti PBMC sono state incubate durante la notte (18 ore) a 37 °C e 5% di CO₂. 200 μ L dei surnatanti sono stati raccolti per la valutazione in IFN α ELISA (PBL InterferonSource).

La FIG. 50 illustra l'impatto di HCQ sulla potenza di BIIIB059. Ogni simbolo rappresenta le concentrazioni di IFN α misurate da un donatore rappresentativo di 2 donatori sani testati e le linee verticali rappresentano la deviazione standard (SD). PBMC da sangue venoso eparinizzato di donatori umani sani o pazienti affetti da LES sono state isolate mediante centrifugazione discontinua con gradiente su Ficoll, lavate in PBS e risospese in terreno di coltura completo (RPMI con FBS al 3%). Le PBMC sono state trattate con concentrazioni

variabili di BIIB059 da solo, HCQ da solo o in combinazione (BIIB059 + HCQ) in un volume di dosaggio totale di 250 μ L/pozzetto. Le concentrazioni di BIIB059 variavano da 10 μ g/mL a 0,1 ng/mL. Le concentrazioni di HCQ variavano da 10 μ M a 156 nM. 1×10^6 cellule/pozzetto PBMC sono state stimolate con 1 μ M del
5 ligando TLR9 (CPG-A). Le piastre contenenti PBMC sono state incubate durante la notte (18 ore) a 37 °C e 5% di CO₂. 200 μ L dei surnatanti sono stati raccolti per la valutazione in IFN α ELISA (PBL InterferonSource).

La FIG. 51 mostra le distribuzioni di percentuale di pDC circolanti nel sangue intero di macaco cinomolgo sana su scala originale (pannello di sinistra) e su
10 scala di registro (pannello di destra). Il sangue intero veniva prelevato da dodici macachi cinomolgo una volta alla settimana per un totale di quattro settimane. Le pDC sono state identificate usando la citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR +. La pDC come percentuale delle cellule CD20-CD14 è stata calcolata con il software FlowJo. Il grafico è stato ottenuto utilizzando il
15 linguaggio R per il calcolo statistico.

La FIG. 52 è una rappresentazione grafica della percentuale di pDC circolante (su scala logaritmica) nel sangue intero di macaco cinomolgo sano per diversi punti temporali prima dell'iniezione IV di BIIB059. Nei punti temporali indicati, è stato prelevato sangue intero e le pDC sono state identificate mediante
20 citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR +. La percentuale di pDCS è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente usando il software R.

La FIG. 53 è una rappresentazione di un modello adattato finale per percentuale di pDC circolante (su scala logaritmica) nel sangue intero di
25 macaco cinomolgo sano in base a diversi punti temporali prima dell'iniezione IV

di BIIB059. Un modello lineare di effetti misti per i valori di log (% pDC) con diversi punti temporali come fattori fissi e cyno come le intercettazioni casuali non mostra differenze tra i rapporti dei valori di % di pDC geometrici medi misurati dalle settimane di differenza (valore p basato su test F per tutti gli effetti 5 temporali pari a zero è 0,67). Il grafico e l'analisi statistica sono stati calcolati usando il linguaggio R per il calcolo statistico. La linea nera mostra il modello adattato finale, che include solo un'intercettazione fissa e le intercettazioni casuali per i macachi cinomolghi. Il pacchetto lme4 in R è stato usato per adattarsi al modello lineare di effetti misti.

10 **La FIG. 54** rappresenta la percentuale di pDC circolante su scala logaritmica prima e dopo la dose IV di veicolo di citrato di sodio, BIIB059 1 mg/kg o BIIB059 10 mg/kg nel macaco cinomolgo. A tre macachi cinomolghi sono stati somministrati per ciascun gruppo di dosaggio al tempo 0. Nei punti temporali indicati, è stato prelevato sangue intero e le pDC sono state identificate 15 mediante citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR +. La percentuale di pDCS è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente usando il software R.

La FIG. 55 rappresenta la percentuale di pDC circolante su scala logaritmica prima e dopo la dose IV di veicolo di citrato di sodio, BIIB059 1 mg/kg o BIIB059 20 10 mg/kg nel macachi cinomolghi. Un modello lineare a effetti misti per i valori di log (% pDC) con fattori fissi per gruppo di dosaggio, livelli di tempo 1 ora, 6 ore e più di 28 giorni e con intercettazione casuale per macachi cinomolghi. La linea continua mostra il modello adattato. Il pacchetto lme4 in R è stato usato per adattarsi al modello lineare di effetti misti. Il grafico e l'analisi statistica sono 25 stati calcolati usando il linguaggio R per il calcolo statistico.

La FIG. 56 mostra percentuale di pDC circolante dopo la dose SC di BIIB059 da 0,2 mg/kg nel macaco cinomolgo. Ai macachi cinomolghi 4, 6 e 12 è stata somministrata una singola iniezione SC di BIIB059 a 0,2 mg/kg al tempo 0. Dei tre macachi cinomolghi, il macaco cinomolgo 6 è stato dosato con BIIB059 5 mg/kg in uno studio precedente. I macachi cinomolghi 4 e 12 sono stati dosati con il veicolo in uno studio precedente. Nei punti temporali indicati, è stato prelevato sangue intero e le pDC sono state identificate mediante citofluorimetria come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR +. La percentuale di pDCS è stata calcolata nel software FlowJo e rappresentata graficamente usando il software R. 10

La FIG. 57 raffigura il modello adattato finale per percentuale di pDC circolante dopo la dose SC di BIIB059 da 0,2 mg/kg nel macaco cinomolgo. Un modello lineare di effetti misti è adattato per i valori di log (% pDC) con effetti fissi per tempo e tempo continui a 1 ora e con macachi cinomolghi come intercettazioni 15 casuali. La linea continua mostra il modello adattato. Il pacchetto lme4 in R è stato usato per adattarsi al modello lineare di effetti misti. Il grafico e l'analisi statistica sono stati calcolati usando il linguaggio R per il calcolo statistico.

La FIG. 58 è una rappresentazione schematica della progettazione sperimentale di PK/PD di macaco cinomolgo. Nove macachi cinomolgo hanno 20 completato lo studio sulla dose endovenosa (IV). I macachi cinomolghi hanno sanguinato prima e dopo la somministrazione endovenosa del veicolo, 1 mg/kg di BIIB059 o 10 mg/kg di BIIB059 secondo il programma di sanguinamento mostrato. Dopo il completamento di questo studio, 3 macachi cinomolghi hanno proseguito uno studio sulla dose sottocutanea (SC), in cui hanno ricevuto una 25 singola iniezione di SC di 0,2 mg/kg di BIIB059. Ad ogni punto di

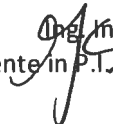
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

sanguinamento, è stato eseguito un test del sangue intero in cui il sangue intero proveniente dai macachi cinomolghi è stato diluito 1:4 con RPMI 1640 completo e stimolato con CPG-A fino a una concentrazione finale di 200 µg/mL in un tessuto con fondo rotondo a 96 pozzetti piastra di coltura e incubata a 37 °C con il 5% di CO₂ per 18-20 ore. Alla fine della coltura, il sangue intero stimolato è stato centrifugato per raccogliere il siero. Nel saggio biologico MxA, le cellule A549 sono state stimolate con il siero raccolto per 19-20 ore a 37 °C con il 5% di CO₂ per indurre la proteina MxA. Dopo 20 ore, le cellule A549 sono state lisate ed è stato eseguito un ELISA sandwich per rilevare le concentrazioni della proteina MxA. I livelli di IFNα (unità/mL) sono stati nuovamente calcolati da una curva standard generata trattando le cellule A549 con dosi crescenti di rIFNα.

La FIG. 59 è una rappresentazione grafica della tendenza verso una ridotta produzione di IFNα indotta da TLR9 in macachi cinomolghi che ricevono una singola dose endovenosa di BIIB059 rispetto alle medie pre-trattamento. Il sangue intero proveniente da macachi cinomolghi trattato con una singola dose endovenosa di veicolo, 1 mg/kg di BIIB059 o 10 mg/kg di BIIB059 è stato diluito 1:4 con RPMI completo 1640 e stimolato con CPG-A (2216) fino a una concentrazione finale di 200 µg/mL in una piastra per coltura di tessuto a fondo circolare a 96 pozzetti e incubata a 37 °C con il 5% di CO₂ per 18-20 ore. Alla fine della coltura, il sangue intero stimolato è stato centrifugato per raccogliere il siero. Le cellule A549 sono state stimolate con il siero raccolto per 19-20 ore a 37 °C con il 5% di CO₂ per indurre la proteina MxA. Dopo 20 ore, le cellule A549 sono state lisate ed è stato eseguito un ELISA sandwich per rilevare le concentrazioni della proteina MxA. I livelli di IFNα (unità/mL) sono stati


nuovamente calcolati da una curva standard generata trattando le cellule A549 con dosi crescenti di rIFN α . La concentrazione media di IFN α pre-sanguinamento è stata calcolata per ogni macaco calcolando la media di tutte le misurazioni di IFN α dai punti di pre-sanguinamento (Giorni -21, -14, -7 e T0).
5 La % di IFN α è stata quindi calcolata per ciascun punto temporale sanguinante in seguito alla somministrazione di BII059 fino al giorno 14 dividendo la concentrazione di IFN α in quel momento per la media pre-sanguinamento per quell'animale e moltiplicando per 100. Questi valori sono stati quindi mediati per ciascun gruppo di trattamento. Il grafico mostra la media \pm errore standard della
10 media. Analisi grafiche e statistiche sono state calcolate utilizzando il software Excel e GraphPad 6.0 (GraphPad, San Diego, CA).

La FIG. 60 è una rappresentazione grafica della riduzione della produzione di IFN α indotta da TLR9 in un saggio su sangue intero *ex vivo* da macachi cinomolgo trattati per via endovenosa con BII059. Il sangue intero proveniente
15 da macachi cinomolghi trattato con una singola dose endovenosa di veicolo (pannello superiore), 1 mg/kg di BII059 (pannello centrale) o 10 mg/kg di BII059 (pannello inferiore) è stato diluito 1:4 con RPMI completo 1640 e stimolato con CPG-A (2216) fino a una concentrazione finale di 200 μ g/mL in una piastra per coltura di tessuto a fondo circolare a 96 pozzetti e incubata a 37
20 °C con il 5% di CO₂ per 18-20 ore. Alla fine della coltura, il sangue intero stimolato è stato centrifugato per raccogliere il siero. Le cellule A549 sono state stimolate con il siero raccolto per 19-20 ore a 37 °C con il 5% di CO₂ per indurre la proteina MxA. Dopo 20 ore, le cellule A549 sono state lisate ed è stato eseguito un ELISA sandwich per rilevare le concentrazioni della proteina
25 MxA. I livelli di IFN α (unità/mL) sono stati nuovamente calcolati da una curva


Ing. mes Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 20587M-041R

standard generata trattando le cellule A549 con dosi crescenti di rIFN α . Un'analisi di varianza a due vie di effetti misti (ANOVA) era adatta a log₁₀ valori delle concentrazioni calcolate di IFN α . I valori di IFN α sono tracciati (su scala log₁₀) rispetto al giorno di sanguinamento per ciascun animale all'interno di
5 ciascun gruppo di dosaggio. Le linee verticali indicano i raggruppamenti di giorni di sanguinamento in pre-dose, post-dose fino a 31 giorni e post-dose superiori a 31 giorni. I giorni di sanguinamento dopo il giorno 31 non sono stati utilizzati nell'analisi. Le stime basate su modello dei valori geometrici medi di IFN α sono rappresentate da spesse linee orizzontali nere all'interno delle
10 regioni pre e post dose di ciascun pannello. Il grafico e l'analisi statistica sono stati calcolati usando il linguaggio R per il calcolo statistico.

La FIG. 61 è una rappresentazione grafica della riduzione della produzione di IFN α indotta da TLR9 in un saggio su sangue intero *ex vivo* da macachi cinomolgo trattati per via sottocutanea con BIIIB059. Il sangue intero
15 proveniente da macachi cinomolghi trattato con una singola dose sottocutanea di 0,2 mg/kg di BIIIB059 è stato diluito 1:4 con RPMI completo 1640 e stimolato con CPG-A (2216) fino a una concentrazione finale di 200 μ g/mL in una piastra per coltura di tessuto a fondo circolare a 96 pozzetti e incubata a 37 °C con il 5% di CO₂ per 18-20 ore. Alla fine della coltura, il sangue intero stimolato è
20 stato centrifugato per raccogliere il siero. Le cellule A549 sono state stimolate con il siero raccolto per 19-20 ore a 37 °C con il 5% di CO₂ per indurre la proteina MxA. Dopo 20 ore, le cellule A549 sono state lisate ed è stato eseguito un ELISA sandwich per rilevare le concentrazioni della proteina MxA. I livelli di IFN α (unità/mL) sono stati nuovamente calcolati da una curva standard
25 generata trattando le cellule A549 con dosi crescenti di rIFN α . Un'analisi


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

unidirezionale della varianza (ANOVA) con effetti casuali era adatta a registrare 10 valori delle concentrazioni calcolate di IFN α . I valori di IFN α sono tracciati (su scala log10) rispetto al giorno di sanguinamento per ciascun animale. Le linee verticali indicano i raggruppamenti di giorni di sanguinamento in pre-dose, 5 post-dose fino a 33 giorni e post-dose superiori a 33 giorni. I giorni di sanguinamento dopo il giorno 33 non sono stati utilizzati nell'analisi. Le stime basate su modello dei valori geometrici medi di IFN α sono rappresentate da spesse linee orizzontali nere all'interno delle regioni pre e post dose di ciascun pannello. Il grafico e l'analisi statistica sono stati calcolati usando il linguaggio R 10 per il calcolo statistico.

Descrizione dettagliata

BIIB059 è un anticorpo monoclonale esemplificativo che si lega specificamente al BDCA2 umano. Gli anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente contesto inibiscono la produzione di pDC e/o la secrezione di citochine 15 e chemochine infiammatorie. Inoltre, gli anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente contesto possono sottoregolare i livelli di CD32a e/o CD62L sulla superficie delle pDC. Inoltre, gli anticorpi anti-BDCA2 della presente descrizione possono mediare l'internalizzazione di BDCA2 dalla superficie dei pDC. Inoltre, gli anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente contesto possono essere utilizzati 20 per impoverire i pDC da ADCC o CDC e possono essere usati per trattare o prevenire disturbi immunologici come condizioni infiammatorie e autoimmuni. La presente descrizione mostra anche che la combinazione di un antimalarico con un anticorpo anti-BDCA2 descritto nel presente contesto può produrre effetti migliori rispetto al trattamento con uno dei due agenti da solo. **BDCA2**

25 BDCA2 è una lectina di tipo C di tipo II che è specificamente espressa su

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 05BM-041R

pDC. BDCA2 è costituito da un singolo dominio extracellulare di riconoscimento dei carboidrati (CRD) nel suo terminale C, una regione transmembrana e una breve coda citoplasmatica nel suo terminale N che non ospita un motivo di segnalazione. BDCA2 trasmette segnali intracellulari attraverso un adattatore transmembrana associato, FcεR1γ (si veda la Figura 1). La ligazione mediata da anticorpo di BDCA2 porta al reclutamento della tirosin chinasi della milza (SYK) nel motivo di attivazione basato su tirosina dell'immunorecettore fosforilato (ITAM) di FcεR1γ. L'attivazione di Syk porta all'attivazione del linker delle cellule B (Blnk), della tirosin chinasi di Bruton (BTK) e della fosfolipasi Cy2 (PLCγ2), portando alla mobilizzazione di Ca²⁺.

La sequenza amminoacidica della proteina umana BDCA2 (accessione Genbank n. NP_569708.1) è mostrata di seguito (il dominio transmembrana è in corsivo; l'ectodominio è sottolineato).

1 MVPEEPPQDR EKGLWVFLK VWSMAVVSIL LLSVCFTVSS VVPHNFMYSK
51 TVKRLSKLRE YQYHPSLTC VMGKDIEDW SCCPTPWTSE QSSCYFISTG
101 MQSWTKSQKN CSVMGADLVV INTREEQDFI IQNLKRNSY FLGLSDPGGR
151 RHWQWVDQTP YNENVTEWHS GEPNNLDERC AIINFRSSEE WGWNDIHCHV
201 PKSICKMKK IYI* (SEQ ID NO:1)

Di seguito è mostrata

la sequenza amminoacidica dell'FcεR1γ umano (accessione Genbank n. NP_004097.1). 51 RKAITSYEK SDGVTGLST RNQETYETLK HEKPPQ* (SEQ ID NO:2)

L'omologo BDCA2 di ratto più vicino, il ratto Clec4b2 (accessione Genbank n. NM_001005896), condivide solo il 51,0% di identità con BDCA2 umano. Al contrario, il cinomolgo e la scimmia rhesus BDCA2 condividono l'identità del 90,6% con il BDCA2 umano. Inoltre, la sequenza di proteine FcεR1γ di cinomolgo e scimmia rhesus, identiche tra loro, condivide l'identità del 98,9% con la proteina FcεR1γ umana.

Le proteine BDCA2 di scimmia rhesus, cinomolgo e umana, possono

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n. 0581-041R

essere utilizzate come immunogeni per preparare anticorpi anti-BDCA2. Per preparare anticorpi umani anti-BDCA2, la proteina umana BDCA2 può essere utilizzata come immunogeno. Gli anticorpi BDCA2 anti-umani possono quindi essere sottoposti a screening per identificare gli anticorpi aventi una o più delle
5 caratteristiche descritte nel presente contesto (ad esempio, ridurre la produzione/secrezione di uno o più interferoni di tipo I o di tipo III, IL-6, TNF- α , MIP- 1- α , MIP-1 β , CCL5 e IP-10/CXCL10; esaurimento delle pDC; in competizione per il legame con il dominio extracellulare di BDCA2 con B1B059; legame selettivo con l'ectodominio di BDCA2 umano, di cinomolgo e rhesus ma
10 non il legame con ratto Clec4b2; l'inibizione dello sviluppo della malattia in un modello di xenotrapianto psoriasico umano).

Anticorpi anti-BDCA2

La presente descrizione include le sequenze di un anticorpo monoclonale, B1B059, che si lega a BDCA2 umano, di cinomolgo e di rhesus,
15 ma non al ratto Clec4b2. B1B059 non si lega o non mostra un legame significativo con BDCA2 da specie filogenetiche al di sotto dei primati. B1B059

B1B059 è un anticorpo IgG1 umanizzato che riconosce in modo specifico BDCA2 sulla superficie delle cellule dendritiche plasmacitoidi. È stato derivato da un anticorpo murino (24F4) che lega BDCA2 come segue. Un plasmide
20 codificante BDCA2 umano a lunghezza intera è stato iniettato nei topi con una pistola genetica. Gli splenociti di questo topo sono stati fusi con le cellule di mieloma e l'ibridoma risultante ha prodotto l'anticorpo 24F4. L'anticorpo 24F4 è stato ingegnerizzato in una struttura IgG1 umana di tipo selvaggio per mantenere la piena funzionalità dell'effettore. Di seguito sono mostrate le
25 sequenze di amminoacidi previste delle catene pesanti e leggere B1B059

Ines Sangiacomo
Consulente in P.V. USBM-041R

mature. Le regioni che determinano la complementarità (CDR) 1, 2 e 3 della catena leggera variabile (VL) e la catena pesante variabile (VH) sono mostrate in quell'ordine dal terminale N a C delle sequenze VL e VH mature e sono sia sottolineate sia in grassetto. Un anticorpo costituito dalla catena pesante matura (SEQ ID NO: 4) e dalla catena leggera matura (SEQ ID NO: 3) elencato di seguito è denominato BIIB059.

Catena leggera (LC) di BIIB059 matura

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYA**A**A**STLES** GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YC**Q**Q**ANEDPR** TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVUCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Catena pesante (HC) di BIIB059 matura

DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS**G**F**TFFS** **TYTMS**WVRQA PGKGLEWVAT **ISP**G**D**S**FGYY** **YPDSV**Q**GRFT**
ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD **IY**Y**NY**G**AWFA** YWGQGLVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST
SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK
PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NRYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GREYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:4)

La catena leggera variabile (VL) di BIIB059 ha la seguente sequenza amminoacidica:

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYA**A**A**STLES** GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YC**Q**Q**ANEDPR** TFGQGTKVEI K (SEQ ID NO:23)

La

La catena pesante variabile (VH) di BIIB059 ha la seguente sequenza amminoacidica:

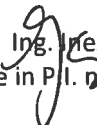
DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS**G**F**TFFS** **TYTMS**WVRQA PGKGLEWVAT **ISP**G**D**S**FGYY** **YPDSV**Q**GRFT**
ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD **IY**Y**NY**G**AWFA** YWGQGLVTV SS (SEQ ID NO:24)

Le sequenze amminoacidiche di CDR di VL di BIIB059 sono elencate di seguito:

CDR1 di VL: KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5);

CDR2 di VL: AASTLES (SEQ ID NO:6); e

CDR3 di VL: QQANEDPRT (SEQ ID NO:7).

Ing.  Yves Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Le sequenze amminoacidiche delle CDR di VH di BII059 sono elencate di seguito:

CDR1 di VH: TYTMS (**SEQ ID NO: 8**) (CDR1 di Kabat) o GFTFSTYTMS (**SEQ ID NO: 9**) (CDR1 di Chothia/AbM potenziata);

5 CDR2 di VH: TISPGDSFGYYYPDSVQG (**SEQ ID NO:10**);

CDR3 di VH: DIYYNYGAWFAY (**SEQ ID NO:11**)

Come indicato sopra, la definizione avanzata di CDR di Chothia/AbM della CDR1 di VH è 5 amminoacidi più lunga della definizione di Kabat di questa CDR. I cinque amminoacidi aggiuntivi di CDR1 di VH di Chothia/AbM potenziati sono GFTFS (**SEQ ID NO: 12**).

Gli anticorpi anti-BDCA2 della presente descrizione possono anche comprendere "CDR alternative" di BII059. Per CDR "alternative" si intendono le CDR (CDR1, CDR2 e CDR3) definite secondo uno qualsiasi tra CDR di Chothia, da Abysis, Chothia/AbM potenziati o dalle definizioni dei contatti.

15 Queste CDR alternative possono essere ottenute, ad esempio, utilizzando il database AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi).

Le sequenze amminoacidiche delle CDR "alternative" 1, 2 e 3 della regione variabile della catena pesante e della regione variabile della catena leggera di BII059 sono confrontate con le CDR definite secondo Kabat nella Tabella seguente.

Dominio	Kabat	Chothia, Abysis	da	Chothia/AbM potenziato	Contatto
CDR1 di VH	TYTMS (SEQ ID NO:8)	GFTFSTY (SEQ ID NO:89)	(SEQ ID NO:90)	GFTFSTYTM S (SEQ ID NO:9)	STYTMS (SEQ ID NO:90)

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.V. n. USBM-041R

Dominio	Kabat	Chothia, Abysis	da	Chothia/AbM potenziato	Contatto
CDR2 di VH	TISPGDSFG YYPDSVQ G (SEQ ID NO:10)	SPGDSFG (SEQ ID NO:91)		TISPGDSFGY Y (SEQ ID NO:92)	WWATISPGDSFG YY (SEQ ID NO:93)
CDR3 di VH:	DIYYNYGA WFAY (SEQ ID NO:11)	DIYYNYGAWFA Y (SEQ ID NO:11)		DIYYNYGAW FAY (SEQ ID NO:11)	TRDIYYNYGAWF A (SEQ ID NO:94)
CDR1 di VL:	KASQSVDY DGDSYMN (SEQ ID NO:5)	KASQSVDYDGD SYMN (SEQ ID NO:5)		KASQSVDYD GDSYMN (SEQ ID NO:5)	DYDGDSYMNWY (SEQ ID NO:95)
CDR2 di VL:	AASTLES (SEQ ID NO:6)	AASTLES (SEQ ID NO:6)		AASTLES (SEQ ID NO:6)	LLIYAASTLE (SEQ ID NO:96)
CDR3 di VL:	QQANEDPR T (SEQ ID NO:7)	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)		QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPR (SEQ ID NO:97)

Gli anticorpi anti-BDCA2 possono comprendere la catena pesante e la catena leggera CDR 1, CDR2 e CDR3 secondo la definizione di Kabat, la definizione di Chothia da Abysis, la definizione avanzata di CDR di Chothia/AbM o la definizione di contatto. Questi anticorpi possono avere, ad esempio, 1, 2 o 3 sostituzioni all'interno di una o più (vale a dire 1, 2, 3, 4, 5 o 6) delle CDR. Questi anticorpi (i) legano BDCA2 umano o di macaco cinomolgo ma non legano significativamente BDCA2 da specie filogenetiche al di sotto dei primati; e/o (ii) inibiscono l'interferenza di tipo I indotta da TLR7/TLR9 e altre produzioni di citochine o chemochine da parte di pDC umane; e/o (iii) mediano l'interiorizzazione di BDCA2 dalla superficie delle pDC; e/o (iv) sottoregolano CD32a e/o CD62L dalla superficie delle pDC; e/o (v) esauriscono le pDC *in vitro* mediante ADCC o CDC.

Gli anticorpi IgG umani sono molecole tetrameriche contenenti due

catene leggere e due catene pesanti. Ogni catena leggera di B1B059 è collegata covalentemente a una catena pesante attraverso un legame disolfuro intercatena (LC Cys 218-HC Cys 225) e le catene pesanti sono accoppiate tra loro da due disolfuri intercatena (HC Cys 231-Cys 231 e Cys 234- Cys 234).

5 Tutte le altre cisteine formano disolfuri intramolecolari che stabilizzano i domini costanti e variabili.

In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi anti-BDCA2 includono una regione di catena pesante e una di catena leggera umana. In determinate forme di realizzazione, la regione costante di catena pesante comprende un

10 dominio CH1 e una regione di cerniera. In alcune forme di realizzazione, la regione di costante di catena pesante comprende un dominio CH3. Se la regione della costante di catena pesante include sostituzioni, tali sostituzioni modificano le proprietà dell'anticorpo (ad esempio, aumentano o diminuiscono

15 uno o più tra: legame del recettore Fc, glicosilazione anticorpale, numero dei residui di cisteina, funzione delle cellule effettrici o funzione del complemento). In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo IgG. In forme di realizzazione specifiche, l'anticorpo è selezionato dal gruppo costituito da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγR1a (CD32a) con un'affinità da 7 µg/mL a

20 15 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγR1I (CD32a) con un EC50 di 10 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγR1a (CD32a) con un EC50 di 11 µg/mL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo include una regione Fc umana che lega FcγR1a

25 (CD32a) con un EC50 di 12 µg/mL. La Tabella 1 fornisce un elenco delle

proprietà dell'anticorpo B1B059.

TABELLA 1

Massa molecolare (attuale stimata/deglicosilata)	146.348,2 Da/146.352 Da
Massa molecolare (catena pesante deglicosilata, prevista/effettiva)	49.425,8 Da/49.424 Da
Massa molecolare (catena leggera, prevista/effettiva)	23.764,3 Da/23.765 Da
Massa molecolare (SDS-PAGE)	150.000 Da
Coefficiente di estinzione (1mg/mL)	1,46 mL/mg/cm a 280 nm
Assorbanza massima	275 nm
pI (calcolato)	7,26
pI (IEF)	Componente principale 7,01 Componenti minori 6,90, 6,81, 6,78, 7,09
EC₅₀ umano BDCA2 (FACS)	7 nM
EC₅₀ cino BDCA2 (FACS)	7 nM
Tm mediante DSC:	CH2: 72 °C Fab: 68,6 °C; 75,9 °C CH3: 85 °C
SH libero	0,4/moli (1,1%)
Glicazione	0,1 moli/moli di B1B059
Glicosilazione legata all'N RRS2	G0 (69,2%) G1 (23,9%) G2 (2,2%) Aglicosilato (1%)
Tampone della formulazione esemplificativo	20 mM di citrato di sodio, 150 mM di NaCl a pH 6,0
Solubilità nel tampone della formulazione	>150 mg/mL
Aggregazione (SEC)	0,2%
Aggregazione (AUC)	0,3% (principalmente dimeri)
T_{1/2}	7,3 giorni nei ratti
Endotossina	<0,05 UE/mg di proteine

BIIB059 presenta proprietà fisico-chimiche adeguate per un anticorpo terapeutico. Questo anticorpo mostra bassi livelli di aggregazione. Il framework IgG1 di tipo selvatico contiene un singolo sito di glicosilazione N-collegato nella molecola e BIIB059 e si lega ai recettori Fc con affinità tipiche di questa classe di molecole. La pI calcolata di 7,26 è piuttosto bassa per un anticorpo. L'eterogeneità della carica rilevata in BIIB059 suggerisce che una frazione significativa di BIIB059 contiene modifiche. Livelli di glicazione fino a circa il 10% rilevati in lotti purificati di BIIB059 rappresentano almeno in parte questa eterogeneità di carica. Il T_m pieghevole per BIIB059 si trova all'estremità inferiore dei valori tipici osservati per gli anticorpi, mentre quelli per i domini CH2 e CH3 sono tipici per un mAb IgG1 completamente glicosilato. Sulla base della fluorimetria a scansione differenziale e della viscosità, BIIB059 può essere formulato, ad esempio, a 50 mg/mL in 20 mM di citrato di sodio, 150 mM di NaCl, pH 6,0. Questo anticorpo può anche essere formulato a concentrazioni molto più elevate, come 150-300 mg/mL (ad esempio, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL, 300 mg/mL).

BIIB059 è un mAb IgG1 completamente umanizzato e competente per la funzione Fc che mostra un'affinità elevata per BDCA2 e si lega ugualmente bene a BDCA2 umano e di cinomolgo nativo. BIIB059 è un potente inibitore di tutti gli IFN di tipo I indotti da TLR9, nonché di altre citochine e chemochine da parte delle pDC. BIIB059 è altrettanto efficace nell'inibire l'interferone di tipo I indotto da TLR9 da pDC da donatori umani sani e pazienti affetti da LES. BIIB059 inibisce in modo specifico l'IFN di tipo I indotto da TLR9 dai pDC e non influisce sulla produzione di IFN da parte di altri tipi di cellule attivati con ligando TLR diverso. BIIB059 porta alla rapida interiorizzazione di BDCA2 dalla

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM=041R

superficie cellulare. Alla stimolazione, BDCA2 si co-localizza con TLR9 nel compartimento endosomale/lisosomiale, il che sembra essere necessario per la sua inibizione della segnalazione di TLR9. È stato scoperto che BIIB059 causa lo spargimento di CD62L dalla superficie delle pDC umane che potrebbero influire sul loro accasamento verso gli organi bersaglio. Studi di citotossicità cellula-mediata *in vitro* (ADCC) e citotossicità complemento-dipendente (CDC) suggeriscono che BIIB059 può avere attività di deplezione cellulare nelle linee cellulari che sovraesprimono BDCA2. Tuttavia, il fatto che BIIB059 porti a una rapida e completa interiorizzazione di BDCA2 dalla superficie dei pDC rende meno probabile che BIIB059 abbia effetti *in vivo* sull'esaurimento prolungato dei pDC. La combinazione di BIIB059 e idrossiclorochina (HCQ) ha portato a un effetto inibitorio additivo sulla produzione IFN α indotta da TLR7 e TLR9 da PBMC da donatori umani sani. Questi dati evidenziano il potenziale beneficio terapeutico additivo di BIIB059 quando somministrato con composti antimalarici come HCQ.

Gli anticorpi, come BIIB059, possono essere prodotti, ad esempio, preparando ed esprimendo geni sintetici che codificano le sequenze di amminoacidi recitate o mutando i geni germinali umani per fornire un gene che codifica le sequenze di amminoacidi recitate. Inoltre, questo anticorpo e altri anticorpi anti-BDCA2 possono essere ottenuti, ad esempio, usando uno o più dei seguenti metodi.

Metodi per ottenere anticorpi anti-BDCA2

Sono disponibili numerosi metodi per ottenere anticorpi, in particolare anticorpi umani. Un metodo esemplare include lo screening di librerie di espressione proteica, ad esempio librerie di visualizzazione di fagi o ribosomi.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.J. n° USBM-041R

La visualizzazione dei fagi è descritta, ad esempio, in US 5.223.409 ; Smith, Science 228: 1315-1317 (1985); WO 92/18619 ; WO 91/17271 ; WO 92/20791 ; WO 92/15679 ; WO 93/01288 ; WO 92/01047 ; WO 92/09690 ; e WO 90/02809. La visualizzazione di Fab sui fagi è descritta, ad esempio, nei brevetti US nn. 5,658,727, 5,667,988e 5,885,793.

Oltre all'uso delle librerie di visualizzazione, è possibile utilizzare altri metodi per ottenere un anticorpo legante BDCA2. Ad esempio, la proteina BDCA2 o un suo peptide può essere usata come antigene in un animale non umano, ad esempio un roditore, ad esempio un topo, un criceto o un ratto. Inoltre, le cellule trasfettate con un cDNA che codifica il BDCA2 possono essere iniettate in un animale non umano come mezzo per produrre anticorpi che legano efficacemente la proteina BDCA2 della superficie cellulare.

In una forma di realizzazione, l'animale non umano include almeno una parte di un gene immunoglobulinico umano. Ad esempio, è possibile progettare ceppi di topo privi della produzione di anticorpi di topo con grandi frammenti di loci Ig umani. Utilizzando la tecnologia degli ibridomi, anticorpi monoclonali specifici per l'antigene derivati dai geni con la specificità desiderata possono essere prodotti e selezionati. Si vedano, ad esempio, XENOMOUSE™, Green et al., Nature Genetics 7: 13-21 (1994), US 2003-0070185, WO 96/34096, e WO 96/33735.

In un'altra forma di realizzazione, un anticorpo monoclonale viene ottenuto dall'animale non umano e quindi modificato, ad esempio, umanizzato o deimmunizzato. Winter descrive un metodo di innesto CDR esemplificativo che può essere usato per preparare anticorpi umanizzati qui descritti (US 5.225.539). Tutti o alcune delle CDR di un anticorpo specifico umano possono

essere sostituiti con almeno una porzione di un anticorpo non umano. Potrebbe essere necessario solo sostituire le CDR richieste per i determinanti di legame o il legame di tali CDR per arrivare a un anticorpo umanizzato utile che si lega a BDCA2.

5 Gli anticorpi umanizzati possono essere generati sostituendo sequenze della regione variabile Fv che non sono direttamente coinvolte nel legame con l'antigene con sequenze equivalenti provenienti da regioni variabili Fv umane. Metodi generali per la generazione di anticorpi umanizzati sono forniti da Morrison, SL, Science, 229: 1202-1207 (1985), di Oi et al., BioTechniques, 4:
10 214 (1986) e da US 5.585.089; US 5.693.761 ; US 5.693.762 ; US 5.859.205 ; e US 6.407.213. Tali metodi includono l'isolamento, la manipolazione e l'espressione delle sequenze di acido nucleico che codificano in tutto o in parte delle regioni variabili FV dell'immunoglobulina da almeno una tra una catena pesante o leggera. Fonti di tale acido nucleico sono ben note agli esperti della
15 tecnica e, ad esempio, possono essere ottenute da un ibridoma che produce un anticorpo contro un bersaglio predeterminato, come descritto sopra, da geni di immunoglobuline germinali o da costrutti sintetici. Il DNA ricombinante che codifica l'anticorpo umanizzato può quindi essere clonato in un vettore di espressione appropriato.

20 Le sequenze germinali umane, ad esempio, sono descritte in Tomlinson, IA et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992); Cook, G. P. et al., Immunol. Today, 16: 237-242 (1995); Chothia, D. et al., J. Mol. Bio. 227: 799-817 (1992); e Tomlinson et al., EMBO J., 14: 4628-4638 (1995). La directory V BASE fornisce un elenco completo di sequenze di regioni variabili di immunoglobuline umane
25 (compilato da Tomlinson, IA et al. MRC Centre for Protein Engineering,

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 05BM-041R

Cambridge, UK). Queste sequenze possono essere utilizzate come fonte di sequenze umane, ad esempio per regioni framework e CDR. Le regioni quadro di consenso umane possono anche essere utilizzate, ad esempio, come descritto nel brevetto US n. 6,300,064.

5 Un anticorpo non umano legante BDCA2 può anche essere modificato mediante una specifica delezione di epitopi di cellule T umane o "deimmunizzazione" mediante i metodi descritti in WO 98/52976 e WO 00/34317. In breve, le regioni variabili a catena leggera e pesante di un anticorpo possono essere analizzate alla ricerca di peptidi che si legano alla
10 classe II MHC; questi peptidi rappresentano potenziali epitopi delle cellule T (come definito in WO 98/52976 e WO 00/34317). Per il rilevamento di potenziali epitopi di cellule T, è possibile applicare un approccio di modellizzazione al computer chiamato "threading peptidico" e inoltre è possibile cercare un database di peptidi di legame di classe II MHC umani per i motivi presenti nelle
15 sequenze V_H e V_L , come descritto in WO 98/52976 e WO 00/34317. Questi motivi si legano a uno qualsiasi dei 18 principali allotipi di classe II MHC DR e costituiscono quindi potenziali epitopi delle cellule T. I potenziali epitopi delle cellule T rilevati possono essere eliminati sostituendo piccoli numeri di residui amminoacidici nelle regioni variabili, o preferibilmente, con singole sostituzioni
20 amminoacidiche. Per quanto possibile, vengono effettuate sostituzioni conservative. Spesso, ma non esclusivamente, si può usare un amminoacido comune a una posizione nelle sequenze di anticorpi germinali umani. Dopo aver identificato i cambiamenti deimmunizzanti, gli acidi nucleici che codificano V_H e V_L possono essere costruiti mediante mutagenesi o altri metodi sintetici
25 (ad esempio sintesi de novo, sostituzione di cassette e così via). Una sequenza

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 2158M-041R

variabile mutagenizzata può, opzionalmente, essere fusa in una regione costante umana, ad esempio IgG1 umana o regioni costanti di kappa.

In alcuni casi, un potenziale epitopo di cellule T includerà residui noti o previsti per essere importanti per la funzione anticorpale. Ad esempio, i
5 potenziali epitopi delle cellule T sono generalmente distorti verso le CDR. Inoltre, possono verificarsi potenziali epitopi delle cellule T in residui di struttura importanti per la struttura e il legame degli anticorpi. Le modifiche per eliminare questi potenziali epitopi richiedono in alcuni casi un maggiore controllo, ad esempio realizzando e testando catene con e senza il cambiamento. Ove
10 possibile, i potenziali epitopi delle cellule T che si sovrappongono alle CDR possono essere eliminati con sostituzioni al di fuori delle CDR. In alcuni casi, un'alterazione all'interno di una CDR è l'unica opzione, quindi è possibile testare varianti con e senza questa sostituzione. In altri casi, la sostituzione richiesta per rimuovere un potenziale epitopo di cellule T si trova in una posizione di
15 residuo all'interno della struttura che potrebbe essere fondamentale per il legame con gli anticorpi. In questi casi, vengono testate le varianti con e senza questa sostituzione. Pertanto, in alcuni casi sono progettate diverse regioni variabili di catena leggera e pesante deimmunizzate varianti e vengono testate varie combinazioni di catene pesanti/leggere per identificare l'anticorpo
20 deimmunizzato ottimale. La scelta dell'anticorpo deimmunizzato finale può quindi essere effettuata considerando l'affinità di legame delle diverse varianti in combinazione con l'estensione della deimmunizzazione, in particolare il numero di potenziali epitopi delle cellule T rimanenti nella regione variabile. La deimmunizzazione può essere utilizzata per modificare qualsiasi anticorpo, ad
25 esempio un anticorpo che include una sequenza non umana, ad esempio un

anticorpo sintetico, un anticorpo murino o altro anticorpo monoclonale non umano o un anticorpo isolato da una libreria di visualizzazione.

Possono anche essere usati altri metodi per umanizzare gli anticorpi. Ad esempio, altri metodi possono spiegare la struttura tridimensionale dell'anticorpo, le posizioni della struttura che sono in prossimità tridimensionale ai determinanti di legame e le sequenze immunogeniche di peptidi. Si veda, ad esempio WO 90/07861 ; brevetti US nn. 5.693.762 ; 5.693.761 ; 5.585.089 ; 5.530.101 ; e 6.407.213 ; Tempest et al. (1991) Biotechnology 9:266-271. Ancora un altro metodo è chiamato "umanità" ed è descritto, ad esempio, in US 2005-008625.

L'anticorpo può includere una regione Fc umana, ad esempio una regione Fc di tipo selvaggio o una regione Fc che include una o più alterazioni. In una forma di realizzazione, la regione costante viene modificata, ad esempio, mutata, per modificare le proprietà dell'anticorpo (ad esempio, per aumentare o diminuire uno o più tra: legame del recettore Fc, glicosilazione anticorpale, numero dei residui di cisteina, funzione delle cellule effettrici o funzione del complemento). Ad esempio, la regione costante di IgG1 umana può essere mutata in uno o più residui, ad esempio uno o più residui 234 e 237 (in base alla numerazione di Kabat). Gli anticorpi possono presentare mutazioni nella regione CH2 della catena pesante che riducono o alterano la funzione dell'effettore, ad esempio il legame con il recettore Fc e l'attivazione del complemento. Ad esempio, gli anticorpi possono avere mutazioni come quelle descritte nei brevetti U.S. n. 5.624.821 e 5.648.260. Gli anticorpi possono anche avere mutazioni che stabilizzano il legame disolfuro tra le due catene pesanti di un'immunoglobulina, come mutazioni nella regione di cerniera di


Ing. Francesco Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

IgG4, come descritto nella tecnica (ad esempio Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105-08]. Si veda, ad esempio anche U.S. 2005-0037000.

Maturazione dell'affinità

In una forma di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 o un suo
5 frammento legante l'antigene viene modificato, ad esempio mediante
mutagenesi, per fornire un pool di anticorpi modificati. Gli anticorpi modificati
vengono quindi valutati per identificare uno o più anticorpi con proprietà
funzionali alterate (ad esempio, miglioramento del legame, migliore stabilità,
ridotta antigenicità o maggiore stabilità *in vivo*). In un'implementazione, la
10 tecnologia della libreria di visualizzazione viene utilizzata per selezionare o
schermare il pool di anticorpi modificati. Gli anticorpi ad alta affinità vengono
quindi identificati dalla seconda libreria, ad esempio, utilizzando un rigore più
elevato o condizioni di legame e lavaggio più competitive. Possono anche
essere utilizzate altre tecniche di screening.

15 In alcune implementazioni, la mutagenesi è indirizzata a regioni note o
che probabilmente si trovano sull'interfaccia di legame. Se, ad esempio, le
proteine leganti identificate sono anticorpi, la mutagenesi può essere diretta
verso le regioni CDR delle catene pesanti o leggere come descritto nel presente
contesto. Inoltre, la mutagenesi può essere diretta verso regioni di framework
20 vicine o adiacenti alle CDR, ad esempio regioni di framework, in particolare
entro 10, 5 o 3 amminoacidi di una giunzione di CDR. Nel caso degli anticorpi,
la mutagenesi può anche essere limitata a una o alcune delle CDR, ad esempio
per apportare miglioramenti graduali.

In una forma di realizzazione, la mutagenesi viene utilizzata per rendere
25 un anticorpo più simile a una o più sequenze germinali. Un metodo di

Fig. Mes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

germinazione esemplificativo può includere: l'identificazione di una o più sequenze germinali che sono simili (ad esempio, più simili in un database specifico) alla sequenza dell'anticorpo isolato. Quindi le mutazioni (a livello di amminoacidi) possono essere effettuate nell'anticorpo isolato, in modo
5 incrementale, in combinazione o entrambi. Ad esempio, viene creata una libreria di acido nucleico che include sequenze che codificano alcune o tutte le possibili mutazioni germinali. Gli anticorpi mutati vengono quindi valutati, ad esempio, per identificare un anticorpo che ha uno o più residui germinali aggiuntivi rispetto all'anticorpo isolato e che è ancora utile (ad esempio, ha
10 un'attività funzionale). In una forma di realizzazione, il maggior numero possibile di residui di linea germinale viene introdotto in un anticorpo isolato.

In una forma di realizzazione, la mutagenesi viene utilizzata per sostituire o inserire uno o più residui germinali in una regione CDR. Ad esempio, il residuo di CDR della linea germinale può provenire da una sequenza germinale
15 che è simile (ad esempio, la più simile) alla regione variabile che viene modificata. Dopo la mutagenesi, l'attività (ad esempio legame o altra attività funzionale) dell'anticorpo può essere valutata per determinare se il residuo o i residui della linea germinale sono tollerati. Una mutagenesi simile può essere eseguita nelle regioni di framework.

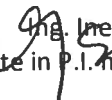
20 La selezione di una sequenza germinale può essere eseguita in diversi modi. Ad esempio, una sequenza germinale può essere selezionata se soddisfa un criterio predeterminato per la selettività o la somiglianza, ad esempio almeno una certa identità percentuale, ad esempio almeno 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 99,5% di identità, rispetto all'anticorpo non umano del
25 donatore. La selezione può essere eseguita utilizzando almeno 2, 3, 5 o 10


Ing. Mes Sangiacomo
Consulente in P.I.P. USBM-041R

sequenze germinali. Nel caso di CDR1 e CDR2, l'identificazione di una sequenza germinale simile può includere la selezione di una tale sequenza. Nel caso di CDR3, l'identificazione di una sequenza germinale simile può includere la selezione di una di tali sequenze, ma può includere l'uso di due sequenze
5 germinali che contribuiscono separatamente alla porzione ammino-terminale e alla porzione carbossi-terminale. In altre implementazioni, vengono utilizzate più di una o due sequenze germinali, ad esempio per formare una sequenza di consenso.

I calcoli dell "'identità di sequenza" tra due sequenze vengono eseguiti
10 come segue. Le sequenze vengono allineate a scopo di confronto ottimale (ad esempio è possibile introdurre dei gap in una o entrambe tra una prima e una seconda sequenza amminoacidica o di acido nucleico per un allineamento ottimale e le sequenze non omologhe possono essere ignorate a scopo di confronto). L'allineamento ottimale è determinato come il miglior punteggio
15 utilizzando il programma GAP nel pacchetto software GCG con una matrice di punteggio Blossum 62 con una penalità di gap di 12, una penalità di estensione di gap 4 e una penalità di gap frameshift di 5. I residui amminoacidici o nucleotidi nelle corrispondenti posizioni amminoacidiche o posizioni nucleotidiche vengono quindi confrontati. Quando una posizione nella prima
20 sequenza è occupata dallo stesso residuo amminoacidico o nucleotide della posizione corrispondente nella seconda sequenza, le molecole in tale posizione sono identiche. L'identità percentuale tra le due sequenze è in funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze.

In altre forme di realizzazione, l'anticorpo può essere modificato per
25 avere un modello di glicosilazione alterato (vale a dire, alterato dal modello di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

glicosilazione originale o nativo). Come utilizzato in questo contesto, "alterato" significa avere uno o più gruppi di carboidrati eliminati e/o avere uno o più siti di glicosilazione aggiunti all'anticorpo originale. L'aggiunta di siti di glicosilazione agli anticorpi attualmente descritti può essere ottenuta alterando la sequenza di amminoacidi per contenere sequenze di consenso del sito di glicosilazione; tali
5 tecniche sono ben note nella tecnica. Un altro mezzo per aumentare il numero di frazioni di carboidrati sugli anticorpi è l'accoppiamento chimico o enzimatico dei glicosidi con i residui di amminoacidi dell'anticorpo. Questi metodi sono descritti, ad esempio, in WO 87/05330, e Aplin e Wriston (1981) CRC Crit. Rev.
10 Biochem., 22:259-306. La rimozione di eventuali porzioni di carboidrati presenti sugli anticorpi può essere effettuata chimicamente o enzimaticamente come descritto nella tecnica [Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 259:52; Edge et al. (1981) Anal. Biochem., 118:131; e Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol., 138:350]. Si vedano ad esempio i brevetti U.S. n. 5.869.046
15 per una modifica che aumenta l'emivita *in vivo* fornendo un epitopo legante il recettore di salvataggio.

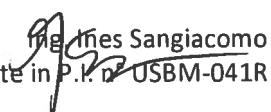
In un caso, un anticorpo ha sequenze CDR (ad esempio, un CDR di Chothia o Kabat) che differiscono da quelle dell'anticorpo monoclonale B1B059. Le sequenze di CDR che differiscono da quelle dell'anticorpo monoclonale
20 B1B059 includono cambiamenti di amminoacidi, come sostituzioni di 1, 2, 3 o 4 amminoacidi se una CDR ha una lunghezza di 5-7 amminoacidi o sostituzioni di 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 di amminoacidi nella sequenza di una CDR se una CDR ha una lunghezza di 10 amminoacidi o superiore. L'amminoacido sostituito può avere cariche, idrofobicità o caratteristiche stereochimiche simili. In alcuni casi,
25 l'una o più sostituzioni di amminoacidi è una sostituzione conservativa. In alcuni

Ing. Irres Sangiacomo
Consulente in P.T. n. 255BM-041R

casi, l'una o più sostituzioni di amminoacidi è una sostituzione non conservativa. Tali sostituzioni rientrano nella competenza ordinaria dell'esperto della tecnica. L'anticorpo o i suoi frammenti di anticorpo che contengono le CDR sostituite possono essere sottoposti a screening per identificare anticorpi
5 aventi una o più delle caratteristiche qui descritte (ad esempio, riduzione della produzione/secrezione di interferoni di tipo I o di tipo III, IL-6, TNF- α , MIP -1- α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, CCL5/RANTES, IP-10/CXCL10; esaurimento dei pDC; in competizione per il legame al dominio extracellulare di BDCA2 con B1B059; associazione selettiva dell'ectodominio di BDCA2 umano, di cinomolgo e di
10 rhesus ma non legando Clec4b2 di ratto o legandosi al Clec4b2 di ratto con un'affinità di legame inferiore rispetto a BDCA2 umano, di cinomolgo o di rhesus; inibizione dello sviluppo della malattia in un modello di xenotrapianto psoriasico umano).

A differenza delle CDR, è possibile apportare cambiamenti più
15 sostanziali nelle regioni di framework (FR) senza influire negativamente sulle proprietà di legame di un anticorpo. Le modifiche alle FR includono, tuttavia senza limitazioni, l'umanizzazione di un framework non derivato dall'uomo o la progettazione di alcuni residui di framework che sono importanti per il contatto con l'antigene o per stabilizzare il sito di legame, ad esempio, cambiando la
20 classe o la sottoclasse della regione costante, cambiando specifici residui amminoacidici che potrebbero alterare una funzione effettrice come il legame del recettore Fc [Lund et al., J. Immun., 147: 2657-62 (1991); Morgan et al., Immunology, 86: 319-24 (1995)] o modificando le specie da cui deriva la regione costante.

25 Gli anticorpi anti-BDCA2 possono essere sotto forma di anticorpi a


Consulente in P.I. n. USBM-041R

lunghezza intera o sotto forma di forme a basso peso molecolare (ad esempio frammenti di anticorpi o minibody biologicamente attivi) degli anticorpi anti-BDCA2, ad esempio Fab, Fab', F (ab')₂, Fv, Fd, dAb, scFv e sc (Fv) 2. Altri anticorpi anti-BDCA2 compresi nella presente descrizione includono anticorpo a dominio singolo (sdAb) contenente una singola catena variabile come, VH o VL, o un suo frammento biologicamente attivo. Si veda, ad esempio, Moller et al., J. Biol. Chem., 285(49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 77(1):13-22 (2007); U.S. 2005/0079574 e Davies et al. (1996) Protein Eng., 9(6):531-7. Come un intero anticorpo, un sdAb è in grado di legarsi selettivamente a un antigene specifico. Con un peso molecolare di soli 12-15 kDa, gli sdAb sono molto più piccoli degli anticorpi comuni e persino più piccoli dei frammenti Fab e dei frammenti variabili a catena singola.

Nel presente contesto sono composizioni comprendenti una miscela di un anticorpo anti-BDCA2 o di un suo frammento legante l'antigene e una o più varianti acide dello stesso, ad esempio, in cui la quantità di una o più varianti acide è inferiore a circa l'80%, il 70%, il 60%, il 60%, il 50%, il 40%, il 30%, il 30%, il 20%, il 10%, il 5% o l'1%. Sono anche previste composizioni comprendenti un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene comprendente almeno un sito di deamidazione, in cui il pH della composizione va da circa 5,0 a circa 6,5, tale che, ad esempio, almeno circa il 90% degli anticorpi anti-BDCA2 non sono deamidati (vale a dire meno del 10% circa degli anticorpi è deamidato). In determinate forme di realizzazione, vengono deamidati meno del 5%, 3%, 2% o 1% circa degli anticorpi. Il pH può essere compreso tra 5,0 e 6,0, come 5,5 o 6,0. In alcune forme di realizzazione, il pH della composizione è 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 o 6,5.

Ines Sangiacomo
Consulente in B.P. n° USBM-041R

Una "variante acida" è una variante di un polipeptide di interesse che è più acido (ad esempio come determinato dalla cromatografia a scambio cationico) rispetto al polipeptide di interesse. Un esempio di una variante acida è una variante deamidata.

5 Una variante "deamidata" di una molecola di polipeptide è un polipeptide in cui uno o più residui di asparagina del polipeptide originale sono stati convertiti in aspartato, vale a dire la catena laterale dell'ammide neutra è stata convertita in un residuo con un acido complessivo personaggio.

10 Il termine "miscela" come usato nel presente contesto in riferimento a una composizione comprendente un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene, indica la presenza sia del desiderato anticorpo anti-BDCA2 o di un suo frammento legante l'antigene e una o più sue varianti acide. Le varianti acide possono comprendere anticorpo anti-BDCA2 prevalentemente deamidato, con quantità minori di altre varianti acide.

15 In determinate forme di realizzazione, l'affinità di legame (K_D), on-rate (K_{Don}) e/o off-rate (K_{Doff}) dell'anticorpo mutato per eliminare la deamidazione è simile a quella dell'anticorpo di tipo selvatico, ad esempio, con una differenza inferiore a circa 5 volte, 2 volte, 1 volta (100%), 50%, 30%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% o 1%.

20 In determinate forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene o suoi anticorpi a basso peso molecolare si legano a BDCA2 su pDC e inibiscono o riducono la produzione e/o la secrezione di pDC di tipo I e IFN di tipo III, IL -6, TNF- α e altre citochine e chemochine infiammatorie (ad esempio MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, CCL5 e
25 IP-10/CXCL10); e/o esaurisce le pDC da ADCC o CDC o apoptosi; e/o riduce la

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in Pat. USBM-041R

gravità dei sintomi quando somministrato a pazienti umani con uno o più o modelli animali di: lupus eritematoso sistemico, lupus cutaneo, lupus discoide, nefrite lupus, sclerodermia, morfea, artrite reumatoide, polimiosite-dermatomiosite, psoriasi, Sindrome di Sjogren, vasculite e diabete di tipo I. In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene o i suoi anticorpi a basso peso molecolare inibiscono lo sviluppo della malattia in un modello di xenotrapianto psoriasico umano [Nestlé et al., J. Exp. Med., 202(1): 135-143 (2005)]. Queste caratteristiche di un anticorpo anti-BDCA2 o di un suo frammento legante l'antigene o dei suoi anticorpi a basso peso molecolare possono essere misurate secondo i metodi descritti negli esempi, nonché mediante altri metodi noti nella tecnica.

Frammenti di anticorpo

Frammenti di anticorpo (ad esempio Fab, Fab', F(ab')₂, Facb e Fv) possono essere preparati mediante digestione proteolitica di anticorpi intatti. Ad esempio, i frammenti di anticorpo possono essere ottenuti trattando l'intero anticorpo con un enzima come papaina, pepsina o plasmina. La digestione della papaina di anticorpi interi produce frammenti di F(ab)₂ o Fab; la digestione della pepsina di anticorpi interi produce F(ab')₂ o Fab'; e la digestione plasmina di anticorpi interi produce frammenti di Facb.

In alternativa, i frammenti di anticorpo possono essere prodotti in modo ricombinante. Ad esempio, gli acidi nucleici che codificano i frammenti di anticorpo di interesse possono essere costruiti, introdotti in un vettore di espressione ed espressi in cellule ospiti adatte. Si vedano, ad esempio, Co, M.S. et al., J. Immunol., 152:2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. and Skerra, A.,


Ines Sangiacomo
Consulente in P.R. n° USBM-041R

Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, (1989) 121:663-669 (1989); e Bird, R.E. et al., TIBTECH, 9:132-137 (1991)]. I frammenti di anticorpo possono essere espressi e secreti da *E. coli*, permettendo così la facile produzione di grandi quantità di questi frammenti. I frammenti di anticorpi possono essere isolati dalle librerie di fagi anticorpali. In alternativa, frammenti di Fab'-SH possono essere direttamente recuperati da *E. coli* e chimicamente accoppiati per formare frammenti di F(ab)₂ [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]. Secondo un altro approccio, i frammenti di F(ab')₂ possono essere isolati direttamente da coltura di cellule ospite ricombinanti. Il frammento di Fab e F(ab')₂ con emivita aumentata *in vivo* comprendente un residuo dell'epitopo legante il recettore di salvataggio sono descritti nel brevetto US n. 5,869,046.

Minibody

15 I minibody di anticorpi anti-BDCA2 includono i diabody, la catena singola (scFv) e la catena singola (Fv)₂ (sc(Fv)₂).

Un "diabody" è un minibody bivalente costruito dalla fusione genica (si veda, ad esempio, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161). I diabody sono dimeri composti da 20 due catene polipeptidiche. I domini VL e VH di ciascuna catena polipeptidica del corpo sono legati da linker. Il numero di residui di amminoacidi che costituiscono un linker può essere compreso tra 2 e 12 residui (ad esempio, 3-10 residui o cinque o circa cinque residui). I linker dei polipeptidi in un diabody sono in genere troppo corti per consentire a VL e VH di legarsi tra loro. 25 Pertanto, VL e VH codificati nella stessa catena polipeptidica non possono


Ines Sangiacomo
Consulente in P.D.° USBM-041R

formare un frammento di regione variabile a catena singola, ma invece formano un dimero con un frammento di regione variabile a catena singola differente. Di conseguenza, un diabody ha due siti di legame dell'antigene.

Uno scFv è un anticorpo polipeptidico a catena singola ottenuto collegando il VH e il VL con un linker (si veda ad esempio Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:5879-5883 (1988); e Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Ed Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)]. L'ordine di VH e VL da collegare non è particolarmente limitato e possono essere organizzati in qualsiasi ordine. Esempi di disposizioni includono: [VH] linker [VL]; o [VL] linker [VH]. La regione V della catena H e la regione V della catena L in un scFv possono essere derivate da qualsiasi anticorpo anti-BDCA2 o suo frammento legante l'antigene qui descritto.

Un sc (Fv) 2 è un minibody in cui due VH e due VL sono collegate da un linker per formare una singola catena [Hudson, et al., J. Immunol. Methods, (1999) 231: 177-189 (1999)]. Un sc (Fv) 2 può essere preparato, ad esempio, collegando scFvs con un linker. Lo sc (Fv) 2 della presente invenzione include anticorpi preferibilmente in cui due VH e due VL sono disposti nell'ordine di: VH, VL, VH e VL ([VH] linker [VL] linker [VH] linker [VL]), a partire dal terminale N di un polipeptide a catena singola; tuttavia l'ordine dei due VH e dei due VL non è limitato alla disposizione di cui sopra e possono essere disposti in qualsiasi ordine. Esempi di disposizioni sono elencati di seguito:

[VL] linker [VH] linker [VH] linker [VL]
[VH] linker [VL] linker [VL] linker [VH]
[VH] linker [VH] linker [VL] linker [VL]

Ing. Yves Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[VL] linker [VL] linker [VH] linker [VH]

[VL] linker [VH] linker [VL] linker [VH]

Normalmente, sono necessari tre linker quando sono collegate quattro regioni variabili di anticorpi; i linker utilizzati possono essere identici o diversi.

5 Non vi è alcuna limitazione specifica sui linker che collegano le regioni VH e VL dei minibody. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker peptidico. Qualsiasi peptide arbitrario a catena singola comprendente da tre a 25 residui (ad esempio 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) può essere usato come linker. Esempi di tali linker peptidici includono: Ser; Gly Ser; Gly Gly Ser; 10 Ser Gly Gly; Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO:13**); Ser Gly Gly Gly (**SEQ ID NO:14**); Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO:15**); Ser Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO: 16**); Gly Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO: 17**); Ser Gly Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO: 18**); Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO: 19**); Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO: 20**); (Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO: 21**))_n, in cui 15 n è un numero intero di uno o più; e (Ser Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO: 22**))_n, in cui n è un numero intero di uno o più.

In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker composto sintetico (agente di reticolazione chimica). Esempi di agenti reticolanti che sono disponibili sul mercato includono N-idrossisuccinimide (NHS), 20 disuccinimidilsuberato (DSS), bis(solfosuccinimidil)suberato (BS3), ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP), ditiobis(solfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), etileneglicolbis(succinimidilsuccinato) (EGS), etileneglicol bis(solfosuccinimidilsuccinato) (solfo-EGS), disuccinimidil tartrato (DST), disolfosuccinimidil tartrato (solfo-DST), bis[2- 25 (succinimidoossicarbonilossi)etil]solfone (BSOCOES), e bis[2-

(solfosuccinimidoossicarbonilossi)etil]solfone (solfo-BSOCOES).

La sequenza amminoacidica di VH o VL nei minibody può includere modifiche come sostituzioni, eliminazioni, aggiunte e/o inserzioni. Ad esempio, la modifica può essere in una o più delle CDR dell'anticorpo anti-BDCA2 o del suo frammento legante l'antigene (ad esempio, B1B059). In determinate forme di realizzazione, la modifica implica una, due o tre sostituzioni di amminoacidi in una o più CDR del dominio VH e/o VL del minibody anti-BDCA2. Tali sostituzioni vengono apportate per migliorare l'attività di legame e/o funzionale del minibody anti-BDCA2. In altre forme di realizzazione, uno, due o tre amminoacidi delle CDR dell'anticorpo anti-BDCA2 o del suo frammento di legame dell'antigene (ad esempio B1B059) possono essere eliminati o aggiunti purché vi sia attività di legame e/o funzionale BDCA2 quando VH e VL sono associati.

Anticorpi bispecifici

Gli anticorpi bispecifici sono anticorpi che hanno specificità di legame per almeno due epitopi diversi. Anticorpi bispecifici esemplificativi possono legarsi a due diversi epitopi della proteina BDCA2. Altri anticorpi del genere possono combinare un sito di legame BDCA2 con un sito di legame per un'altra proteina. Gli anticorpi bispecifici possono essere preparati come anticorpi a lunghezza intera o loro forme a basso peso molecolare (ad esempio F(ab')₂ anticorpi bispecifici, sc (Fv)₂ anticorpi bispecifici, anticorpi bispecifici del corpo).

La produzione tradizionale di anticorpi bispecifici a lunghezza intera si basa sulla co-espressione di due coppie di catena leggera-catena pesanti immunoglobuliniche, in cui le due catene hanno specificità diverse [Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)]. In un approccio diverso, i domini variabili

Ing. Mes Sangiacomo
Consulente in P.T. n° USBM-041R

dell'anticorpo con le specificità di legame desiderate sono fusi con sequenze di domini costanti di immunoglobuline. I DNA che codificano le fusioni a catena pesante di immunoglobuline e, se desiderato, la catena leggera di immunoglobuline, vengono inseriti in vettori di espressione separati e sono
5 trasfettati in una cellula ospite adatta. Questo fornisce una maggiore flessibilità nella regolazione delle proporzioni dei tre frammenti di polipeptidi. È tuttavia possibile inserire le sequenze di codifica per due o tutte e tre le catene polipeptidiche in un singolo vettore di espressione quando l'espressione di almeno due catene polipeptidiche in proporzioni uguali porta a rese elevate.

10 Secondo un altro approccio descritto nel brevetto US n. 5.731.168, l'interfaccia tra una coppia di molecole di anticorpi può essere progettata per massimizzare la percentuale di eterodimeri che vengono recuperati dalla coltura cellulare ricombinante. L'interfaccia preferita comprende almeno una parte del dominio C_{H3}. In questo metodo, una o più catene laterali amminoacidiche
15 piccole dall'interfaccia della prima molecola di anticorpo vengono sostituite con catene laterali più grandi (ad esempio tirosina o triptofano). "Cavità" compensatorie di dimensione identica o simile sulle catene laterali grandi vengono create sull'interfaccia della seconda molecola di anticorpo sostituendo
20 catene laterali amminoacidiche grandi con catene più piccole (ad es. alanina o treonina). Questo fornisce un meccanismo per aumentare la resa dell'eterodimero sui prodotti finali indesiderati quali omodimeri.

Gli anticorpi bispecifici includono anticorpi reticolati o "eteroconiugati". Ad es. uno degli anticorpi nell'eteroconiugato può essere accoppiato ad avidina, l'altro a biotina. Anticorpi eteroconiugati possono essere realizzati utilizzando
25 qualsiasi metodo di reticolazione opportuno.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 0581M-041R

La tecnologia "diabody" fornisce un meccanismo alternativo per produrre frammenti di anticorpi bispecifici. I frammenti comprendono un VH collegato a un VL da un linker che è troppo corto per consentire l'accoppiamento tra i due domini sulla stessa catena. Di conseguenza, i domini VH e VL di un frammento sono forzati ad accoppiarsi con i domini VL e VH complementari di un altro frammento, formando così due siti antigene-leganti.

Anticorpi multivalenti

Un anticorpo multivalente può essere interiorizzato (e/o catabolizzato) più velocemente di un anticorpo bivalente da una cellula che esprime un antigene a cui si legano gli anticorpi. Gli anticorpi descritti nel presente contesto possono essere anticorpi multivalenti con tre o più siti di legame dell'antigene (ad esempio, anticorpi tetraivalenti), che possono essere facilmente prodotti dall'espressione ricombinante di acido nucleico che codifica le catene polipeptidiche dell'anticorpo. L'anticorpo multivalente può comprendere un dominio di dimerizzazione e tre o più siti antigene-leganti. Un dominio di dimerizzazione esemplificativo comprende (o è costituito da) una regione Fc o una regione di cerniera. Un anticorpo multivalente può comprendere (o essere costituito da) da tre a circa otto (ad esempio quattro) siti di legame dell'antigene. L'anticorpo multivalente comprende opzionalmente almeno una catena polipeptidica (ad esempio, almeno due catene polipeptidiche), in cui le catene polipeptidiche comprendono due o più domini variabili. Ad esempio, le catene polipeptidiche possono comprendere $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, in cui VD1 è un primo dominio variabile, VD2 è un secondo dominio variabile, Fc è una catena polipeptidica di un Fc regione, X1 e X2 rappresentano un amminoacido o un distanziatore peptidico e n è 0 o 1.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

Anticorpi coniugati

Gli anticorpi descritti nel presente contesto possono essere anticorpi coniugati che sono legati a varie molecole tra cui sostanze macromolecolari come polimeri [ad esempio Polietilenglicole (PEG), polietilenimina (PEI) modificati con PEG (PEI-PEG), acido poligluttammico (PGA) Copolimeri (N-(2-
5 idrossipropil) metacrilammide (HPMA)], acido ialuronico, materiali radioattivi (ad esempio ^{90}Y , ^{131}I) sostanze fluorescenti, sostanze luminescenti, apteni, enzimi, chelati metallici, droghe e tossine [ad esempio Calceamicina, *Pseudomonas esotossina A*, ricina (ad esempio catena ricina deglicosilata A)].

10 In una forma di realizzazione, per migliorare le azioni citotossiche degli anticorpi anti-BDCA2 e, di conseguenza, la loro efficacia terapeutica, gli anticorpi sono coniugati con sostanze altamente tossiche, inclusi radioisotopi e agenti citotossici. Questi coniugati possono trasportare selettivamente un carico tossico nel sito bersaglio (vale a dire, cellule che esprimono l'antigene
15 riconosciuto dall'anticorpo) mentre le cellule che non sono riconosciute dall'anticorpo vengono risparmiate. Al fine di minimizzare la tossicità, i coniugati sono generalmente progettati sulla base di molecole con una breve emivita sierica (quindi, l'uso di sequenze murine e isotipi di IgG3 o IgG4).

In determinate forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 o un suo
20 frammento legante l'antigene sono modificati con una porzione che migliora la sua stabilizzazione e/o ritenzione in circolazione, ad esempio nel sangue, nel siero o in altri tessuti, ad esempio almeno 1,5, 2, 5, 10 o 50 volte. Ad esempio, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene possono essere associati (ad esempio, coniugati a) un polimero, ad esempio un polimero
25 sostanzialmente non antigenico, come un ossido di polialchilene o un ossido di

Ing. Mes Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

polietilene. I polimeri adatti variano sostanzialmente in base al peso. Possono essere usati polimeri con pesi medi in numero molecolare che vanno da circa 200 a circa 35.000 Dalton (o da circa 1.000 a circa 15.000 e da 2.000 a circa 12.500). Ad esempio, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante
5 l'antigene possono essere coniugati a un polimero solubile in acqua, ad esempio un polimero polivinilico idrofilo, ad esempio polivinilalcol o polivinilpirrolidone. Esempi di tali polimeri includono omopolimeri di ossido di polialchilene come polietilenglicole (PEG) o glicoli polipropilenici, polioli poliossietilenati, loro copolimeri e loro copolimeri a blocchi, a condizione che
10 venga mantenuta la solubilità in acqua dei copolimeri a blocchi. Altri polimeri utili includono poliossialchileni come poliossietilene, poliossipropilene e copolimeri a blocchi di poliossietilene e poliossipropilene; polimetacrilati; carbomeri; e polisaccaridi ramificati o non ramificati.

Gli anticorpi coniugati sopra descritti possono essere preparati
15 eseguendo modifiche chimiche sugli anticorpi o sulle loro forme a peso molecolare inferiore descritte nel presente contesto. I metodi per modificare gli anticorpi sono ben noti nella tecnica (ad esempio US 5057313 e US 5156840).

Metodi di produzione degli anticorpi

Gli anticorpi possono essere prodotti in cellule batteriche o eucariotiche.
20 Alcuni anticorpi, ad esempio di Fab, possono essere prodotti in cellule batteriche, ad esempio cellule di *E. coli*. Gli anticorpi possono anche essere prodotti in cellule eucariotiche come linee cellulari trasformate (ad esempio CHO, 293E, COS). Inoltre, gli anticorpi (ad esempio ScFv) possono essere espressi in una cellula di lievito come *Pichia* (si veda ad esempio Powers et al.,
25 *J Immunol Methods*. 251:123-35 (2001)], *Hanseula* o *Saccharomyces*. Per

M. B. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

produrre l'anticorpo di interesse, viene costruito un polinucleotide che codifica l'anticorpo, introdotto in un vettore di espressione e quindi espresso in cellule ospiti adatte. Le tecniche standard di biologia molecolare sono utilizzate per preparare il vettore di espressione ricombinante, trasfettare le cellule ospiti, 5 selezionare i trasformanti, coltivare le cellule ospiti e recuperare l'anticorpo.

Se l'anticorpo deve essere espresso nelle cellule batteriche (ad esempio, *E. coli*), il vettore di espressione dovrebbe avere caratteristiche che consentano l'amplificazione del vettore nelle cellule batteriche. Inoltre, quando *E. coli* come JM109, DH5 α , HB101 o XL1-Blue viene utilizzato come ospite, il vettore deve 10 avere un promotore, ad esempio un promotore lacZ [Ward et al., 341: 544-546 (1989), araB promoter (Better et al., Science, 240: 1041-1043 (1988)] o promotore T7 che può consentire un'espressione efficiente in *E. coli*. Esempi di tali vettori includono, ad esempio, i vettori serie M13, i vettori serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress 15 system" (QIAGEN), pEGFP e pET (quando viene utilizzato questo vettore di espressione, l'ospite è preferibilmente BL21 che esprime T7 RNA polimerasi). Il vettore di espressione può contenere una sequenza di segnali per la secrezione di anticorpi. Per la produzione nel periplasma di *E. coli*, la sequenza del segnale *pelB* [Lei et al., J. Bacteriol., 169: 4379 (1987)] può essere usato come 20 sequenza di segnali per la secrezione di anticorpi. Per l'espressione batterica, si possono usare metodi di cloruro di calcio o metodi di elettroporazione per introdurre il vettore di espressione nella cellula batterica.

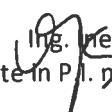
Se l'anticorpo deve essere espresso in cellule animali come cellule CHO, COS e NIH3T3, il vettore di espressione include un promotore necessario per 25 l'espressione in queste cellule, ad esempio un promotore SV40 [Mulligan et al.,

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° ISBM-041R

Nature, 277: 108 (1979)], Promotore MMLV-LTR, promotore EF1 α [Mizushima et al., Nucleic Acids Res., 18: 5322 (1990)] o promotore CMV. Oltre alla sequenza di acido nucleico che codifica l'immunoglobulina o il suo dominio, i vettori di espressione ricombinante possono trasportare sequenze aggiuntive, come sequenze che regolano la replicazione del vettore nelle cellule ospiti (ad esempio, origini della replicazione) e geni marcatori selezionabili. Il gene marcatore selezionabile facilita la selezione delle cellule ospiti in cui è stato introdotto il vettore (si veda ad esempio il brevetto US nn. 4,399,216, 4,634,665e 5,179,017). Ad esempio, tipicamente il gene marcatore selezionabile conferisce resistenza ai farmaci come G418, igromicina o metotrexato su una cellula ospite in cui è stato introdotto il vettore. Esempi di vettori con marcatori selezionabili includono pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV e pOP13.

In una forma di realizzazione, gli anticorpi sono prodotti in cellule di mammifero. Cellule ospite di mammifero esemplificative per l'espressione di un anticorpo includono cellule ovariche di criceto cinese (cellule CHO) [includono le cellule dhfr-CHO descritte in Urlaub e Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizzate con un marker selezionabile di DHFR ad esempio come descritto in Kaufman e Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), 293 cellule renali embrionali umane (ad esempio 293, 293E, 293T), cellule COS, cellule NIH3T3, linee cellulari linfocitarie, ad esempio cellule del mieloma NS0 e cellule SP2, e una cellula di un animale transgenico, ad esempio un mammifero transgenico. Ad esempio, la cellula è una cellula epiteliale mammaria.

In un sistema esemplare per l'espressione di anticorpi, un vettore di espressione ricombinante che codifica sia la catena pesante dell'anticorpo sia

Ing.  Francesco Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 05SBM-041R

la catena leggera dell'anticorpo di un anticorpo anti-BDCA2 (ad esempio B1B059) viene introdotto nelle cellule *dhfr*⁺ CHO mediante trasfezione mediata da fosfato di calcio. All'interno del vettore di espressione ricombinante, i geni di catena pesante e leggera dell'anticorpo sono ciascuno operativamente legato a
5 elementi regolatori di potenziatori/promotori (ad esempio derivati da SV40, CMV, adenovirus e simili, come un elemento regolatore del potenziatore di CMV/promotore di AdMLP o un elemento regolatore del potenziatore di SV40 /promotore di AdMLP) per condurre elevati livelli di trascrizione dei geni. Il vettore di espressione ricombinante porta anche un gene DHFR, che consente
10 la selezione di cellule CHO che sono state trasfettate con il vettore utilizzando selezione/amplificazione con metotrexato. Le cellule ospite di trasformante scelte sono coltivate per consentire l'espressione delle catene pesante e leggera dell'anticorpo e l'anticorpo viene recuperato dal terreno di coltura.

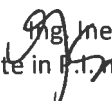
Gli anticorpi possono anche essere prodotti da un animale transgenico.
15 Ad esempio il brevetto U.S. n. 5,849,992 descrive un metodo per esprimere un anticorpo nella ghiandola mammaria di un mammifero transgenico. Viene costruito un transgene che include un promotore specifico per il latte e acidi nucleici codificanti l'anticorpo di interesse e una sequenza di segnale per la secrezione. Il latte prodotto dalle femmine di tali mammiferi transgenici include,
20 secreto al suo interno, l'anticorpo di interesse. L'anticorpo può essere purificato dal latte, oppure utilizzato direttamente per alcune applicazioni. Sono anche forniti animali comprendenti uno o più degli acidi nucleici qui descritti.

Gli anticorpi della presente descrizione possono essere isolati dall'interno o dall'esterno (come un mezzo) della cellula ospite e purificati come anticorpi
25 sostanzialmente puri e omogenei. I metodi di isolamento e purificazione

comunemente usati per la purificazione di anticorpi possono essere usati per l'isolamento e la purificazione di anticorpi e non sono limitati a nessun metodo specifico. Gli anticorpi possono essere isolati e purificati selezionando e combinando opportunamente, ad esempio, cromatografia su colonna, 5 filtrazione, ultrafiltrazione, salatura, precipitazione con solvente, estrazione con solvente, distillazione, immunoprecipitazione, elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS, focalizzazione isoelettrica, dialisi e ricristallizzazione. La cromatografia comprende, ad esempio, cromatografia di affinità, cromatografia a scambio ionico, cromatografia idrofobica, filtrazione su gel, cromatografia in 10 fase inversa e cromatografia ad adsorbimento (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). La cromatografia può essere eseguita utilizzando la cromatografia in fase liquida come HPLC e FPLC. Le colonne utilizzate per la cromatografia di affinità includono la colonna 15 A della proteina e la colonna G della proteina. Esempi di colonne che utilizzano la colonna di proteina A includono Hyper D, POROS e Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). La presente descrizione include anche anticorpi che sono altamente purificati usando questi metodi di purificazione.

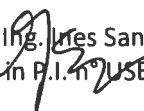
Caratterizzazione degli anticorpi

20 Le proprietà leganti BDCA2 degli anticorpi qui descritte possono essere misurate mediante qualsiasi metodo standard, ad esempio uno o più dei seguenti metodi: OCTET[®], Surface Plasmon Resonance (SPR), analisi BIACORE[™], dosaggio immunoassorbente enzimatico (ELISA), EIA (test immunoenzimatico), RIA (test radioimmunologico) e trasferimento di energia di 25 risonanza fluorescente (FRET).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 205BM-041R

L'interazione di legame di una proteina di interesse (un anticorpo anti-BDCA2) e un bersaglio (ad esempio, BDCA2) può essere analizzata utilizzando i sistemi OCTET®. In questo metodo, una delle numerose varianti di strumenti (ad esempio OCTET® QK^e e QK), realizzate dalla società FortéBio, vengono
5 utilizzate per determinare le interazioni tra proteine, specificità di legame e mappatura degli epitopi. I sistemi OCTET® forniscono un modo semplice per monitorare l'associazione in tempo reale misurando le variazioni della luce polarizzata che viaggia verso il basso su un puntale personalizzato e quindi su un sensore.

10 L'interazione di legame di una proteina di interesse (un anticorpo anti-BDCA2) e un bersaglio (ad esempio, BDCA2) può essere analizzata utilizzando la risonanza plasmonica di superficie (SPR). SPR o Biomolecular Interaction Analysis (BIA) rileva le interazioni biospecifiche in tempo reale, senza
15 etichettare nessuno degli interagenti. I cambiamenti nella massa sulla superficie di legame (indicativo di un evento di legame) del chip BIA provocano alterazioni dell'indice di rifrazione della luce vicino alla superficie [il fenomeno ottico della risonanza plasmonica di superficie (SPR)]. I cambiamenti nella rifrazione generano un segnale rilevabile, che viene misurato come indicazione di reazioni
20 descritti, ad esempio, nel brevetto U.S. n. 5,641,640; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander e Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705 e risorse on-line fornite da BIAcore International AB (Uppsala, Svezia). Le informazioni provenienti da SPR possono essere utilizzate per fornire una misura accurata e
25 quantitativa della costante di dissociazione dell'equilibrio (K_d) e parametri

Ing.  Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

cinetici, inclusi K_{on} e K_{off} , per il legame di una biomolecola a un bersaglio.

Gli epitopi possono anche essere mappati direttamente valutando la capacità di anticorpi diversi di competere tra loro per legarsi al BDCA2 umano usando tecniche cromatografiche BIACORE [Pharmacia BIAtechnology
5 Handbook, "Epitope Mapping", Section 6.3.2, (maggio 1994); Guarda anche
John et al. (1993) J. Immunol. Methods, 160:191-198]

Quando si impiega un test immunoenzimatico, un campione contenente un anticorpo, ad esempio, un surnatante di coltura di cellule produttrici di anticorpi o un anticorpo purificato viene aggiunto a una piastra rivestita di
10 antigene. Viene aggiunto un anticorpo secondario marcato con un enzima come la fosfatasi alcalina, la piastra viene incubata e dopo il lavaggio viene aggiunto un substrato enzimatico come il p-nitrofenilfosfato e viene misurata l'assorbanza per valutare l'attività di legame dell'antigene.

Ulteriori indicazioni generali per la valutazione di anticorpi, ad esempio
15 Western blot e saggi di immunoprecipitazione, sono disponibili in Antibodies: A Laboratory Manual, ed. by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor press (1988)]

Depositi

Un ibridoma che produce l'anticorpo monoclonale anti-BDCA2 designato ibridoma murino BDCA2-1P24F4.1.1.1 è stato depositato presso l'American
20 Type Culture Collection (ATCC) ai sensi del Trattato di Budapest sul riconoscimento internazionale del deposito di microrganismi ai fini della procedura di brevetto il 15 gennaio 2013 e reca il numero di accessione PTA-13450. I richiedenti riconoscono il loro dovere di sostituire i depositi qualora il depositario non fosse in grado di fornire un campione quando richiesto a causa
25 delle condizioni del deposito prima della scadenza del termine di un brevetto

emesso nel presente contesto. I richiedenti riconoscono inoltre la propria responsabilità di comunicare all'ATCC l'emissione di tale brevetto, momento in cui il deposito sarà reso disponibile al pubblico. Prima di quel momento, il deposito sarà reso disponibile al Commissario per i brevetti secondo i termini di

5 37 CFR § 1.14 e 35 USC § 112.

Anticorpi con funzione di effettore alterata

L'interazione di anticorpi e complessi anticorpo-antigene con le cellule del sistema immunitario innesca una varietà di risposte, qui indicate come funzioni effettrici. Le funzioni effettrici immuno-mediate comprendono due

10 meccanismi principali: citotossicità cellula-mediata (anticorpo-dipendente) (ADCC) e citotossicità complemento-dipendente (CDC). Entrambi sono mediati dalla regione costante della proteina immunoglobulinica. Il dominio Fc dell'anticorpo è, quindi, la parte che definisce le interazioni con i meccanismi dell'effettore immunitario.

15 Gli anticorpi IgG attivano le vie effettrici del sistema immunitario legandosi ai membri della famiglia dei recettori Fcγ della superficie cellulare e al C1q del sistema del complemento. La legatura delle proteine effettrici da parte di anticorpi raggruppati innesca una serie di risposte, tra cui il rilascio di citochine infiammatorie, la regolazione della produzione di antigeni, l'endocitosi

20 e l'uccisione cellulare. In alcune applicazioni cliniche queste risposte sono cruciali per l'efficacia di un anticorpo monoclonale. In altri provocano effetti collaterali indesiderati come l'infiammazione e l'eliminazione delle cellule portanti l'antigene. Di conseguenza, la presente invenzione si riferisce inoltre alle proteine leganti il BDCA2, inclusi gli anticorpi, con funzioni effettrici alterate,

25 ad esempio, aumentate o ridotte.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 2581/2015/041R

La funzione di effettore di un anticorpo anti-BDCA2 della presente invenzione può essere determinata usando uno dei molti saggi noti. La funzione di effettore dell'anticorpo anti-BDCA2 può essere aumentata o ridotta rispetto a un secondo anticorpo anti-BDCA2. In alcune forme di realizzazione, il secondo anticorpo anti-BDCA2 può essere qualsiasi anticorpo che lega specificamente BDCA2. In altre forme di realizzazione, il secondo anticorpo specifico per BDCA2 può essere uno qualsiasi degli anticorpi dell'invenzione, come B1B059. In altre forme di realizzazione, in cui l'anticorpo anti-BDCA2 di interesse è stato modificato per aumentare o ridurre la funzione di effettore, il secondo anticorpo anti-BDCA2 può essere la versione non modificata o parentale dell'anticorpo.

Le funzioni di effettore comprendono la citotossicità cellula-mediata (ADCC) mediata da anticorpi, per cui gli anticorpi legano i recettori Fc alle cellule T citotossiche, le cellule natural killer (NK) o i macrofagi che portano alla morte cellulare e la citotossicità dipendente dal complemento (CDC), che è la morte cellulare indotta dall'attivazione della cascata del complemento [rassegna in Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997); Ward and Ghetie, Therapeutic Immunol., 2:77-94 (1995); e Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]. Tali funzioni di effettore richiedono generalmente che la regione Fc sia combinata con un dominio vincolante (ad esempio un dominio variabile di anticorpi) e possa essere valutata usando saggi standard noti nell'arte (si vedano, ad esempio, WO 05/018572, WO 05/003175, e US 6.242.195).

Le funzioni di effettore possono essere evitate usando frammenti di anticorpi privi del dominio Fc come Fab, Fab'2 o Fv a catena singola. Un'alternativa è usare l'anticorpo del sottotipo IgG4, che si lega a FcγRI ma che

si lega male a C1q, FcγRII e RIII. Il sottotipo IgG2 ha anche un legame ridotto con i recettori Fc, ma mantiene un legame significativo con l'allotipo H131 di FcγRIIa e con C1q. Pertanto, sono necessarie ulteriori modifiche nella sequenza Fc per eliminare il legame con tutti i recettori Fc e con C1q.

5 Diverse funzioni di effettore anticorpale, incluso l'ADCC, sono mediate dai recettori Fc (FcR), che legano la regione Fc di un anticorpo. L'affinità di un anticorpo per un FcR specifico, e quindi l'attività di effettore mediata dall'anticorpo, può essere modulata alterando la sequenza amminoacidica e/o modificazioni post-traduzionali dell'Fc e/o della regione costante dell'anticorpo.

10 Gli FcR sono definiti dalla loro specificità per gli isotipi delle immunoglobuline; i recettori Fc per gli anticorpi IgG sono indicati come FcγR, per IgE come FcεR, per IgA come FcαR e così via. Sono state identificate tre sottoclassi di FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16). Sia FcγRII sia FcγRIII hanno due tipi: FcγRIIa (CD32a) e FcγRIIB (CD32b); e FcγRIIIA
15 (CD16a) e FcγRIIIB (CD16b). Poiché ogni sottoclasse FcγR è codificata da due o tre geni e lo splicing alternativo dell'RNA porta a trascrizioni multiple, esiste un'ampia diversità nelle isoforme FcγR. Ad esempio, FcγRII (CD32) include le isoforme IIa, IIb1, IIb2 IIb3 e IIc.

 Il sito di legame sugli anticorpi umani e murini per FcγR è stato
20 precedentemente mappato sulla cosiddetta "regione della cerniera inferiore" costituita da residui 233-239 (numerazione dell'indice UE come in Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Woof et al., Molec. Immunol. 23:319-330 (1986); Duncan et al., Nature 332:563 (1988); Canfield e
25 Morrison, J. Exp. Med. 173:1483-1491 (1991); Chappel et al., Proc. Natl. Acad.

Ines Sangiacomo
Consulente in P.V. USBM-041R

Sci USA 88:9036-9040, (1991)]. Dei residui 233-239, P238 e S239 sono tra quelli citati come probabilmente coinvolti nel legame. Altre aree precedentemente citate probabilmente coinvolte nel legame a FcγR sono: G316-K338 (IgG umana) per FcγRI umano [Woof et al., Mol. Immunol., 23: 319-330 (1986)]; K274-R301 (IgG1 umana) per FcγRIII umano [Sarmay et al., Molec. Immunol. 21: 43-51 (1984)]; e Y407-R416 (IgG umana) per FcγRIII umano [Gergely et al., Biochem. Soc. Trans. 12: 739-743 (1984) e Shields et al., J Biol Chem 276: 6591-6604 (2001), Lazar GA et al., Proc Natl Acad Sci 103: 4005-4010 (2006). Questi e altri tratti o regioni di residui di amminoacidi coinvolti nel legame FcR possono essere evidenti all'esperto della tecnica da un esame delle strutture cristalline dei complessi Ig-FcR (si veda, ad esempio, Sondermann et al. 2000 Nature 406(6793):267-73 e Sondermann et al. 2002 Biochem Soc Trans. 30 (4):481-6]. Di conseguenza, gli anticorpi anti-BDCA2 della presente invenzione includono modifiche di uno o più dei suddetti residui (per aumentare o diminuire la funzione dell'effettore secondo necessità).

Un altro approccio per alterare la funzione di effettore dell'anticorpo monoclonale include gli amminoacidi mutanti sulla superficie dell'anticorpo monoclonale coinvolti nelle interazioni di legame di effettore [Lund, J., et al. (1991) J. Immunol. 147(8): 2657-62; Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276(9): 6591-604].

I metodi per aumentare la funzione di effettore degli anticorpi sono ben noti nella tecnica (si veda, ad esempio, Kelley et al., Methods Mol. Biol., 901: 277-93 (2012); Natsume et al., Drug Des Devel Ther., 3: 7-16 (2009); US 8.188.231, US 7.960.512). In una forma di realizzazione, gli anticorpi BDCA2 hanno una, due, tre, quattro, cinque, sei, sette o più sostituzioni di amminoacidi

in una posizione selezionata dal gruppo costituito da 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 5 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336 e 337, in cui la numerazione dei residui nella regione Fc è quella dell'indice UE come in Kabat. In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi BDCA2 hanno una, due, tre, quattro, cinque, sei, sette o più delle sostituzioni di

10 amminoacidi selezionate dal gruppo costituito da: D221K, D221Y, K222E, K222Y, T223E, T223K, H224E, H224Y, T225E, T225K, T225W, P227E, P227G, P227K, P227Y, P228E, P228G, P228K, P228Y, P230A, P230E, P230G, P230Y, A231E, A231G, A231K, A231P, A231Y, P232E, P232G, P232K, P232Y, E233A, E233D, E233F, E233G, E233H, E233I, E233K, E233L,

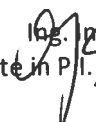
15 E233M, E233N, E233Q, E233R, E233S, E233T, E233V, E233W, E233Y, L234A, L234D, L234E, L234F, L234G, L234H, L234I, L234K, L234M, L234N, L234P, L234Q, L234R, L234S, L234T, L234V, L234W, L234Y, L235A, L235D, L235E, L235F, L235G, L235H, L235I, L235K, L235M, L235N, L235P, L235Q, L235R, L235S, L235T, L235V, L235W, L235Y, G236A, G236D, G236E, G236F,

20 G236H, G236I, G236K, G236L, G236M, G236N, G236P, G236Q, G236R, G236S, G236T, G236V, G236W, G236Y, G237D, G237E, G237F, G237H, G237I, G237K, G237L, G237M, G237N, G237P, G237Q, G237R, G237S, G237T, G237V, G237W, G237Y, P238D, P238E, P238F, P238G, P238H, P238I, P238K, P238L, P238M, P238N, P238Q, P238R, P238S, P238T, P238V,

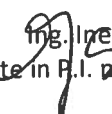
25 P238W, P238Y, S239D, S239E, S239F, S239G, S239H, S239I, S239K, S239L,

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.T. n° USBM-041R

S239M, S239N, S239P, S239Q, S239R, S239T, S239V, S239W, S239Y,
V240A, V240I, V240M, V240T, F241D, F241E, F241L, F241R, F241S, F241W,
F241Y, F243E, F243H, F243L, F243Q, F243R, F243W, F243Y, P244H, P245A,
K246D, K246E, K246H, K246Y, P247G, P247V, D249H, D249Q, D249Y,
5 R255E, R255Y, E258H, E258S, E258Y, T260D, T260E, T260H, T260Y, V262A,
V262E, V262F, V262I, V262T, V263A, V263I, V263M, V263T, V264A, V264D,
V264E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264K, V264L, V264M, V264N, V264P,
V264Q, V264R, V264S, V264T, V264W, V264Y, D265F, D265G, D265H,
D265I, D265K, D265L, D265M, D265N, D265P, D265Q, D265R, D265S,
10 D265T, D265V, D265W, D265Y, V266A, V266I, V266M, V266T, S267D,
S267E, S267F, S267H, S267I, S267K, S267L, S267M, S267N, S267P, S267Q,
S267R, S267T, S267V, S267W, S267Y, H268D, H268E, H268F, H268G,
H268I, H268K, H268L, H268M, H268P, H268Q, H268R, H268T, H268V,
H268W, E269F, E269G, E269H, E269I, E269K, E269L, E269M, E269N,
15 E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y, D270F, D270G,
D270H, D270I, D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R, D270S, D270T,
D270W, D270Y, P271A, P271D, P271E, P271F, P271G, P271H, P271I,
P271K, P271L, P271M, P271N, P271Q, P271R, P271S, P271T, P271V,
P271W, P271Y, E272D, E272F, E272G, E272H, E272I, E272K, E272L, E272M,
20 E272P, E272R, E272S, E272T, E272V, E272W, E272Y, V273I, K274D, K274E,
K274F, K274G, K274H, K274I, K274L, K274M, K274N, K274P, K274R, K274T,
K274V, K274W, K274Y, F275L, F275W, N276D, N276E, N276F, N276G,
N276H, N276I, N276L, N276M, N276P, N276R, N276S, N276T, N276V,
N276W, N276Y, Y278D, Y278E, Y278G, Y278H, Y278I, Y278K, Y278L,
25 Y278M, Y278N, Y278P, Y278Q, Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W,

Ing. Inés Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 041R


D280G, D280K, D280L, D280P, D280W, G281D, G281E, G281K, G281N,
G281P, G281Q, G281Y, V282E, V282G, V282K, V282P, V282Y, E283G,
E283H, E283K, E283L, E283P, E283R, E283Y, V284D, V284E, V284L, V284N,
V284Q, V284T, V284Y, H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W, H285Y,
5 N286E, N286G, N286P, N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H,
K290L, K290N, K290W, P291D, P291E, P291G, P291H, P291I, P291Q, P291T,
R292D, R292E, R292T, R292Y, E293F, E293G, E293H, E293I, E293L, E293M,
E293N, E293P, E293R, E293S, E293T, E293V, E293W, E293Y, E294F,
E294G, E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S, E294T,
10 E294V, E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I,
Q295M, Q295N, Q295P, Q295R, Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y,
Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296H, Y296I, Y296K, Y296L, Y296M, Y296N,
Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297E, N297F, N297G,
N297H, N297I, N297K, N297L, N297M, N297P, N297Q, N297R, N297S,
15 N297T, N297V, N297W, N297Y, S298D, S298E, S298F, S298H, S298I, S298K,
S298M, S298N, S298Q, S298R, S298T, S298W, S298Y, T299A, T299D,
T299E, T299F, T299G, T299H, T299I, T299K, T299L, T299M, T299N, T299P,
T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, T299Y, Y300A, Y300D, Y300E,
Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P, Y300Q, Y300R, Y300S,
20 Y300T, Y300V, Y300W, R301D, R301E, R301H, R301Y, V302I, V303D,
V303E, V303Y, S304D, S304H, S304L, S304N, S304T, V305E, V305T, V305Y,
W313F, K317E, K317Q, E318H, E318L, E318Q, E318R, E318Y, K320D,
K320F, K320G, K320H, K320I, K320L, K320N, K320P, K320S, K320T, K320V,
K320W, K320Y, K322D, K322F, K322G, K322H, K322I, K322P, K322S, K322T,
25 K322V, K322W, K322Y, V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324L,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 25858/041R

S324M, S324P, S324R, S324T, S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D,
N325E, N325F, N325G, N325H, N325I, N325K, N325L, N325M, N325P,
N325Q, N325R, N325S, N325T, N325V, N325W, N325Y, K326I, K326L,
K326P, K326T, A327D, A327E, A327F, A327H, A327I, A327K, A327L, A327M,
5 A327N, A327P, A327R, A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A,
L328D, L328E, L328F, L328G, L328H, L328I, L328K, L328M, L328N, L328P,
L328Q, L328R, L328S, L328T, L328V, L328W, L328Y, P329D, P329E, P329F,
P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S,
P329T, P329V, P329W, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L,
10 A330M, A330N, A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y,
P331D, P331F, P331H, P331I, P331L, P331M, P331Q, P331R, P331T, P331V,
P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332F, I332H, I332K, I332L, I332M,
I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F,
E333H, E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334L,
15 K334P, K334T, T335D, T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N,
T335P, T335R, T335S, T335V, T335W, T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E,
S337H, e S337N, in cui la numerazione dei residui nella regione Fc è quella
dell'indice UE come in Kabat. In una forma di realizzazione specifica, gli
anticorpi BDCA2 comprendono una, due o tre delle seguenti mutazioni: S239D,
20 S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S239D/I332E/G236A, S298A, A330L
I332E, E333A e K334A.

La presenza di oligosaccaridi, in particolare l'oligosaccaride N-legato ad
asparagine-297 nel dominio CH2 di IgG1, è importante per il legame con FcγR e
C1q. Ridurre il contenuto di fucosio negli anticorpi migliora la funzione di
25 effettore (si veda, ad esempio, US 8.163.551). In determinate forme di

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 1581/58M-041R

realizzazione, gli anticorpi BDCA2 hanno ridotto la fucosilazione e le sostituzioni di amminoacidi che aumentano la funzione di effettore (ad esempio, una, due o tre delle seguenti mutazioni: S298A; E333A e K334A). La funzione di effettore può anche essere raggiunta preparando ed esprimendo gli anticorpi anti-BDCA2 qui descritti in presenza di inibitori dell'alfa-mannosidasi I (ad esempio Kifunensina) a una concentrazione dell'inibitore di circa 60-200 ng/mL (ad esempio 60 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL, 150 ng/mL). Gli anticorpi espressi in presenza di inibitori dell'alfa-mannosidasi I contengono principalmente glicani di tipo oligomannosio e generalmente dimostrano un aumento dell'attività e un'affinità dell'ADCC per FcγRIIIA, ma una riduzione del legame C1q.

Gli anticorpi anti-BDCA2 della presente descrizione con una maggiore funzione effettrice comprendono anticorpi con una maggiore affinità di legame per uno o più recettori Fc (FcR) rispetto a un genitore o anticorpo anti-BDCA2 non variante. Di conseguenza, gli anticorpi anti-BDCA2 con una maggiore affinità di legame FcR includono anticorpi anti-BDCA2 che presentano un aumento di 1,5 volte, 2 volte, 2,5 volte, 3 volte, 4 volte o 5 volte o superiore nell'affinità di legame a uno o più recettori Fc rispetto a un progenitore o anticorpo anti-BDCA2 non variante. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 con funzione effettrice aumentata si lega a un FcR con un'affinità circa 10 volte maggiore rispetto a un anticorpo progenitore o non variante. In altre forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 con funzione di effettore aumentata si lega a un FcR con un'affinità circa 15 volte maggiore o con un'affinità circa 20 volte maggiore rispetto a un anticorpo progenitore o non variante. Il recettore FcR può essere uno o più tra FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII e loro isoforme, e FcεR, FcμR, FcδR e/o un FcαR. In forme di

realizzazione specifiche, un anticorpo anti-BDCA2 con funzione effettrice aumentata presenta un aumento di 1,5 volte, 2 volte, 2,5 volte, 3 volte, 4 volte o 5 volte o più in alto nell'affinità di legame con FcγRIIa.

Per ridurre la funzione di effettrice, è possibile utilizzare combinazioni di
5 diversi segmenti di sequenza di sottotipi (ad esempio combinazioni di IgG2 e IgG4) per dare una maggiore riduzione nel legame ai recettori Fcγ rispetto ai due sottotipi da soli [Armour et al., Eur. J. Immunol., 29:2613-1624 (1999); Mol. Immunol., 40:585-593 (2003)]. Inoltre, i siti di glicosilazione N-legata possono essere rimossi come mezzo per ridurre la funzione di effettrice. Sono noti nella
10 tecnica un gran numero di varianti di Fc aventi affinità alterate e/o ridotte per alcuni o tutti i sottotipi di recettori Fc (e quindi per le funzioni effettrici). Si vedano ad esempio US 2007/0224188; US 2007/0148171; US 2007/0048300; US 2007/0041966; US 2007/0009523; US 2007/0036799; US 2006/0275283; US 2006/0235208; US 2006/0193856; US 2006/0160996; US 2006/0134105;
15 US 2006/0024298; US 2005/0244403; US 2005/0233382; US 2005/0215768; US 2005/0118174; US 2005/0054832; US 2004/0228856; US 2004/132101; US 2003/158389; si vedano anche US 7,183,387; 6,737,056; 6,538,124; 6,528,624; 6,194,551; 5,624,821; 5,648,260.

Gli anticorpi anti-BDCA2 della presente invenzione con funzione di
20 effettrice ridotta includono anticorpi con ridotta affinità di legame per uno o più recettori Fc (FcR) rispetto a un progenitore o anticorpo anti-BDCA2 non variante. Di conseguenza, gli anticorpi anti-BDCA2 con una ridotta affinità di legame FcR includono anticorpi anti-BDCA2 che presentano una diminuzione di 1,5 volte, 2 volte, 2,5 volte, 3 volte, 4 volte o 5 volte o superiore nell'affinità di
25 legame a uno o più recettori Fc rispetto a un progenitore o anticorpo anti-

BDCA2 non variante. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 con funzione di effettore ridotta si lega a un FcR con un'affinità circa 10 volte minore rispetto a un anticorpo progenitore o non variante. In altre forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 con funzione di effettore ridotta si lega a un FcR con un'affinità circa 15 volte minore o con un'affinità circa 20 volte minore rispetto a un anticorpo progenitore o non variante. Il recettore FcR può essere uno o più tra FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII e loro isoforme, e FcεR, FcμR, FcδR e/o un FcαR. In forme di realizzazione specifiche, un anticorpo anti-BDCA2 con funzione di effettore ridotta presenta una diminuzione di 1,5 volte, 2 volte, 2,5 volte, 3 volte, 4 volte o 5 volte o più in alto nell'affinità di legame con FcγRIIa.

Nel CDC, il complesso anticorpo-antigene lega il complemento, determinando l'attivazione della cascata del complemento e la generazione del complesso di attacco della membrana. L'attivazione del percorso del complemento classico è iniziata dal legame del primo componente del sistema del complemento (C1q) agli anticorpi (della sottoclasse appropriata) che sono legati al loro antigene affine; pertanto l'attivazione della cascata del complemento è regolata in parte dall'affinità di legame dell'immunoglobulina con la proteina C1q. Per attivare la cascata del complemento, è necessario che C1q si leghi ad almeno due molecole di IgG1, IgG2 o IgG3, ma solo una molecola di IgM, attaccata al bersaglio antigenico [Ward e Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995) p. 80]. Per valutare l'attivazione del complemento, un saggio CDC, ad esempio come descritto in Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996), può essere eseguito.

È stato proposto che vari residui della molecola di IgG siano coinvolti nel

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 2015BM-041R

legame con C1q inclusi i residui Glu318, Lys320 e Lys322 sul dominio CH2, il residuo 331 di amminoacido situato a turno in prossimità dello stesso filamento beta, i residui Lys235 e Gly237 situati nella regione della cerniera inferiore e i residui da 231 a 238 situati nella regione N-terminale del dominio CH2 (si veda
5 ad esempio Xu et al., J. Immunol. 150:152A (Riassunto) (1993),WO94/29351; Tao et al, J. Exp. Med., 178:661-667 (1993); Brekke et al., Eur. J. Immunol., 24:2542-47 (1994); Burton et al; Nature, 288:338-344 (1980); Duncan e Winter, Nature 332:738-40 (1988); Idusogie et al J Immunol 164: 4178-4184 (2000; U.S. 5,648,260, e U.S. 5,624,821).

10 Gli anticorpi Ant-BDCA2 con un legame C1q migliorato possono comprendere una sostituzione di amminoacidi in una, due, tre o quattro posizioni degli amminoacidi 326, 327, 333 e 334 della regione umana IgG Fc, dove la numerazione dei residui nella regione di IgG Fc è quello dell'indice UE come in Kabat. In una forma di realizzazione, gli anticorpi anti-BDCA2
15 includono le seguenti sostituzioni di amminoacidi: K326W/E333S, che sono noti per aumentare il legame di un anticorpo IgG1 con C1q [Steurer W. et al., J Immunol., 155 (3): 1165-74 (1995)].

Gli anticorpi Ant-BDCA2 con un legame C1q ridotto possono comprendere una sostituzione di amminoacidi in una, due, tre o quattro
20 posizioni degli amminoacidi 270, 322, 329 e 331 della regione umana IgG Fc, dove la numerazione dei residui nella regione di IgG Fc è quello dell'indice UE come in Kabat. Come esempio in IgG1, due mutazioni nella regione terminale COOH del dominio CH2 di IgG1-K322A umano e P329A non attivano la via CDC e hanno dimostrato di provocare una riduzione di oltre 100 volte nel
25 legame C1q [US 6.242.195].

Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 della presente invenzione mostra un legame aumentato o ridotto a una proteina del complemento rispetto a un secondo anticorpo anti-BDCA2. In determinate forme di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 dell'invenzione
5 mostra un legame aumentato o ridotto a C1q di un fattore di circa 1,5 volte o più, circa 2 volte o più, circa 3 volte o più, circa 4 volte o più, circa 5 volte o più, circa 6 volte o più, circa 7 volte o più, circa 8 volte o più, circa 9 volte o più, circa 10 volte o più, o circa 15 volte o più, rispetto a un secondo anticorpo anti-BDCA2.

10 Pertanto, in determinate forme di realizzazione dell'invenzione, uno o più di questi residui possono essere modificati, sostituiti o rimossi o uno o più residui di aminoacidi possono essere inseriti in modo da aumentare o ridurre l'attività CDC degli anticorpi anti-BDCA2 fornito nel presente contesto.

In alcune altre forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce un
15 anticorpo anti-BDCA2 che presenta un legame ridotto con uno o più recettori FcR ma che mantiene la sua capacità di legare il complemento (ad esempio, a un simile o, in alcune forme di realizzazione, a un minore misura di un anticorpo nativo, non variante o progenitore anti-BDCA2). Di conseguenza, un anticorpo anti-BDCA2 della presente invenzione può legarsi e attivare il complemento
20 mentre esibisce un legame ridotto a un FcR, come ad esempio FcγRIIIa (ad esempio, FcγRIIIa espresso su piastrine). Un tale anticorpo con legame ridotto o nullo a FcγRIIIa (come FcγRIIIa espresso su piastrine, per esempio) ma che può legare C1q e attivare la cascata del complemento ad almeno un certo grado ridurrà il rischio di eventi tromboembolici pur mantenendo funzioni effettrici forse
25 desiderabili. In forme di realizzazione alternative, un anticorpo anti-BDCA2 della

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

presente invenzione mostra un legame ridotto a uno o più FcR ma mantiene la sua capacità di legare uno o più altri FcR. Si vedano, ad esempio, US 2007-0009523, 2006-0194290, 2005-0233382, 2004-0228856, e 2004-0191244, che descrivono varie modificazioni di amminoacidi che generano anticorpi con ridotto legame a FcRI, FcRII e/o FcRIII, nonché sostituzioni di amminoacidi che provocano un aumento del legame con un FcR ma un legame ridotto con un altro FcR.


Di conseguenza, le funzioni di effetore che coinvolgono la regione costante di un anticorpo anti-BDCA2 possono essere modulate modificando le proprietà della regione costante, e in particolare della regione Fc. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 avente una funzione effettrice aumentata o ridotta viene confrontato con un secondo anticorpo con funzione effettrice e che può essere un anticorpo non variante, nativo o genitore comprendente una costante nativa o una regione Fc che media la funzione effettrice.

Una "regione Fc di sequenza nativa o costante" comprende una sequenza amminoacidica identica alla sequenza amminoacidica di una regione Fc trovata in natura. Preferibilmente, una molecola di controllo utilizzata per valutare la funzione dieffettore relativa comprende la stessa regione Fc di tipo/sottotipo dell'anticorpo variante o di prova. Una regione variante o Fc alterata o costante comprende una sequenza di amminoacidi che differisce da quella di una regione di catena pesante di sequenza nativa in virtù di almeno una modifica di amminoacidi (come, ad esempio, modifica post-traduzionale, sostituzione di amminoacidi, inserimento o eliminazione). Di conseguenza, la regione di costante variante può contenere una o più sostituzioni, delezioni o

inserzioni di amminoacidi che si traducono in alterazioni post-traduzionali alterate, incluso, ad esempio, un modello di glicosilazione alterato. Un anticorpo genitore o una regione Fc è, ad esempio, una variante con normale funzione di effettore utilizzata per costruire una regione costante (vale a dire Fc) che ha alterato, ad esempio, una maggiore funzione di effettore.

Anticorpi con alterazioni (ad esempio aumento) dell'una o più funzioni di effettore possono essere generati dall'ingegneria o dalla produzione di anticorpi con costante di variante, Fc o regioni a catena pesante. La tecnologia del DNA ricombinante e/o le condizioni di coltura e di espressione cellulare possono essere utilizzate per produrre anticorpi con funzione e/o attività alterate. Ad esempio, la tecnologia del DNA ricombinante può essere utilizzata per progettare una o più sostituzioni, delezioni o inserzioni di amminoacidi in regioni (come, ad esempio, Fc o regioni costanti) che influenzano la funzione dell'anticorpo, comprese le funzioni di effettori. In alternativa, cambiamenti nelle modifiche post-traduzionali, come ad esempio i modelli di glicosilazione, possono essere ottenuti manipolando la cellula ospite e le colture cellulari e le condizioni di espressione attraverso le quali viene prodotto l'anticorpo.

La presente invenzione si riferisce a un anticorpo anti-BDCA2 comprendente sequenze CDR di catena pesante selezionate tra CDR1 di VH di SEQ ID NO: 9, CDR2 di VH di SEQ ID NO: 10 e CDR3 di VH di SEQ ID NO: 11; e sequenze CDR di catena leggera selezionate tra CDR1 di VL o SEQ ID NO: 5, CDR2 di VL di SEQ ID NO: 6 e CDR3 di VL di SEQ ID NO: 7. Questi anticorpi anti-BDCA2 i) inibiscono la secrezione di interferoni di tipo I e/o interferoni di tipo III oltre ad altre citochine e chemochine da cellule dendritiche plasmacitoidi; e/o (ii) indurre o potenziare l'esaurimento delle cellule dendritiche

Ing.  Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 088M-041R

plasmacitoidi *in vitro*.

L'invenzione riguarda un anticorpo anti-BDCA2 comprendente una sequenza VL comprendente SEQ ID NO: 23, l'anticorpo comprendente inoltre una regione Fc variante che conferisce una funzione effettrice ridotta rispetto a una regione Fc nativa o parentale. L'invenzione riguarda un anticorpo anti-BDCA2 comprendente una sequenza VH comprendente SEQ ID NO: 24, l'anticorpo comprendente inoltre una regione Fc variante che conferisce una funzione effettrice ridotta rispetto a una regione Fc nativa o parentale.

I metodi per generare una qualsiasi delle summenzionate varianti di anticorpi anti-BDCA2 comprendenti sostituzioni di amminoacidi sono ben noti nella tecnica. Questi metodi includono, tuttavia senza limitazioni, una preparazione mediante mutagenesi sito-diretta (o mediata da oligonucleotidi), mutagenesi PCR e cassetta di mutagenesi di una molecola di DNA preparata che codifica l'anticorpo o almeno la regione costante dell'anticorpo. La mutagenesi sito-diretta è ben nota nella tecnica [si veda, ad esempio, Carter et al., Nucleic Acids Res., 13: 4431-4443 (1985) e Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1987)]. La mutagenesi PCR è adatta anche per la realizzazione di varianti di sequenze di amminoacidi del polipeptide di partenza. Si veda Higuchi, in Protocolli PCR, pp.177-183 (Academic Press, 1990); e Vallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989)]. Un altro metodo per preparare varianti di sequenza, la mutagenesi di cassette, si basa sulla tecnica descritta da Wells et al., Gene, 34: 315-323 (1985).

Anticorpi anti-BDCA2 con glicosilazione alterata

Diversi glicoforni possono influenzare profondamente le proprietà di un terapeutico, tra cui farmacocinetica, farmacodinamica, interazione tra recettori e

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. U2BM-041R

bersagliamento specifico per tessuto (Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3: 285-297). In particolare, per gli anticorpi, la struttura oligosaccaridica può influenzare le proprietà rilevanti per la resistenza alle proteasi, l'emivita sierica dell'anticorpo mediata dal recettore FcRn, la fagocitosi e il feedback anticorpale, oltre alle funzioni di effettore dell'anticorpo (ad esempio completano il complesso C1, che induce il CDC, e si legano ai recettori FcγR, che sono responsabili della modulazione della via ADCC) (Nose e Wigzell, 1983; Leatherbarrow e Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, PNAS, 89: 4285-4289).

Di conseguenza, un altro mezzo per modulare la funzione di effettore degli anticorpi include l'alterazione della glicosilazione della regione di costante dell'anticorpo. La glicosilazione alterata include, ad esempio, una diminuzione o un aumento del numero di residui glicosilati, una modifica del modello o della posizione dei residui glicosilati, nonché una modifica delle strutture zuccherine. Gli oligosaccaridi presenti nelle IgG umane influenzano il loro grado di funzione di effettore (Raju, TS BioProcess International aprile 2003. 44-53); la microeterogeneità degli oligosaccaridi IgG umani può influire sulle funzioni biologiche come CDC e ADCC, legandosi a vari recettori Fc e legandosi alla proteina C1q [Wright A. & Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604; Shields et al. J Biol Chem. 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et al. J Biol Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176-80]. Ad esempio, la capacità delle IgG di legare C1q e attivare la cascata del complemento può dipendere dalla presenza, assenza o modifica della porzione di carboidrati posizionata tra i due domini CH2 (che è normalmente ancorato ad Asn297) [Ward e Ghetie,

Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995)].

I siti di glicosilazione in un polipeptide contenente Fc, ad esempio un anticorpo come un anticorpo IgG, possono essere identificati mediante tecniche standard. L'identificazione del sito di glicosilazione può essere sperimentale o
5 basato su analisi di sequenza o dati di modellamento. I motivi di consenso, ovvero la sequenza amminoacidica riconosciuta da varie glicosil transferasi, sono stati descritti. Ad esempio, il motivo di consenso per un motivo di N-glicosilazione è frequentemente NXT o NXS, dove X può essere qualsiasi amminoacido eccetto la prolina. Vari algoritmi per localizzare un potenziale
10 motivo di glicosilazione sono anche stati descritti. Di conseguenza, per identificare potenziali siti di glicosilazione all'interno di un anticorpo o frammento contenente Fc, la sequenza dell'anticorpo viene esaminata, ad esempio, utilizzando database disponibili pubblicamente come il sito Internet fornito dal Center for Biological Sequence Analysis (si veda NetNGlyc per prevedere siti di
15 N-glicosilazione) e NetOGlyc per prevedere siti di O-glicosilazione).

Studi *in vivo* hanno confermato la riduzione della funzione di effettore degli anticorpi aglicosilici. Ad esempio, un anticorpo anti-CD8 aglicosilico non è in grado di impoverire le cellule portatrici di CD8 nei topi (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062) e un anticorpo anti-CD3 aglicosilico non induce la
20 sindrome da rilascio di citochine nei topi o negli esseri umani (Boyd, 1995 *supra*; Amico, 1999 Trapianto 68: 1632). Anche le forme aglicosilate dell'anticorpo BDCA2 hanno una funzione di effettore ridotta.

È importante sottolineare che, mentre la rimozione dei glicani nel dominio CH2 sembra avere un effetto significativo sulla funzione effettrice, altre
25 proprietà funzionali e fisiche dell'anticorpo rimangono inalterate. In particolare, è

stato dimostrato che la rimozione dei glicani non ha avuto quasi alcun effetto sull'emivita sierica e si è legata all'antigene (Nose, 1983 *supra*; Tao, 1989 *supra*; Dorai, 1991 *supra*; Hand, 1992 *supra*; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949).

5 Gli anticorpi anti-BDCA2 della presente invenzione possono essere modificati o alterati per provocare una o più funzioni effettrici aumentate o diminuite (rispetto a un secondo anticorpo specifico per BDCA2). Metodi per alterare i siti di glicosilazione degli anticorpi sono descritti, ad esempio, in US 6.350.861 e US 5.714.350, WO 05/18572 e WO 05/03175 ; questi metodi
10 possono essere usati per produrre anticorpi anti-BDCA2 della presente invenzione con glicosilazione alterata, ridotta o assente.

Indicazioni

Un anticorpo anti-BDCA2 descritto nel presente contesto può essere usato per trattare o prevenire una varietà di disturbi immunologici, come i
15 disturbi infiammatori e autoimmuni. Gli anticorpi anti-BDCA2 sono utili per trattare o prevenire tali disturbi almeno perché disabilitano o riducono i pDC e/o inibiscono le citochine infiammatorie e le chemochine prodotte dai pDC e/o sottoregolano il CD32a e/o inibiscono la stimolazione del complesso immunitario dei pDC e/o sottoregolare o causare lo spargimento di CD62L. Gli
20 anticorpi anti-BDCA2 della presente descrizione possono essere combinati con un agente antimalarico (ad esempio HCQ) per migliorare gli effetti terapeutici nel trattamento dei disturbi infiammatori e autoimmuni. Gli anticorpi anti-BDCA2 possono essere utilizzati per ridurre i livelli di citochine e chemochine come: interferoni di tipo I, interferoni di tipo III, IL-6, TNF- α , MIP1- α e MIP1- β , CCL5 e
25 IP-10. Gli IFN di tipo I costituiscono una famiglia di citochine a più membri,

inclusi 13 sottotipi di IFN- α , IFN- β , - ϵ , - κ , - ω , - δ e - τ . [Theofilopoulos, Annu. Rev. Immunol., 23:307-36 (2005)]. Gli interferoni di tipo III sono costituiti da tre molecole di IFN- λ chiamate IFN- λ 1, IPN- λ 2 e IPN- λ 3 (indicate anche come IL29, IL28A e IL28B, rispettivamente). Riducendo e/o attenuando la funzione pDC, gli anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente documento forniscono un
5 approccio terapeutico più robusto rispetto ai trattamenti che tentano di ridurre specifici sottotipi IFN con anticorpi neutralizzanti. Inoltre, l'approccio terapeutico incentrato sul pDC degli anticorpi anti-BDCA2 è più selettivo e potenzialmente più sicuro del blocco globale della risposta IFN. Ad esempio, gli anticorpi anti-
10 BDCA2 descritti nel presente contesto eliminano efficacemente gli IFN di tipo I derivati dal pDC mantenendo al contempo altre fonti di IFN che potrebbero essere necessarie in caso di infezioni virali.

Il termine "trattamento" si riferisce alla somministrazione di una composizione qui descritta in una quantità, modo e/o modalità efficace per
15 migliorare una condizione, un sintomo o un parametro associato a un disturbo o per prevenire la progressione o l'esacerbazione del disturbo (incluso danno secondario causato dal disturbo) in misura statisticamente significativa o rilevabile da un esperto della tecnica.

Le malattie o le condizioni che possono essere trattate con un anticorpo
20 anti-BDCA2 descritto nel presente contesto includono, ad esempio, lupus eritematoso sistemico (LES) (ad esempio lupus moderato o grave), lupus cutaneo, lupus discoide, nefrite lupica, sclerosi sistemica (sclerodermia), morfea, psoriasi, artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale (IBD), deratomiosite, polimiosite e diabete di tipo I.

25 LES è una malattia autoimmune cronica in cui più organi sono

danneggiati da complessi immunitari e autoanticorpi che si legano ai tessuti (si veda Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults, Arthritis & Rheumatism, 42(9):1785-1795 (1999)). Gli autoanticorpi sono presenti in LES e possono precedere lo sviluppo della malattia clinica [Arbuckle et al., N. Engl. J. Med., 349 (16): 1526-33 (2003)].

L'interiorizzazione degli autoanticorpi contenenti complessi immunitari attraverso i recettori Fc porta alla produzione di interferone di tipo I che a sua volta promuove la perdita di tolleranza, perpetuando il circolo vizioso dell'autoimmunità [Means et al., Ann NY Acad Sci., 1062: 242-51 (2005)].

LES è eterogeneo per quanto riguarda la presentazione clinica, il decorso, la prognosi e la genetica. Gli afroamericani condividono un aumentato rischio di LES che è spesso più grave rispetto ai pazienti bianchi. Le carenze di complemento sono state riconosciute presto come fattori di rischio per lo sviluppo di LES. Più recentemente, sono stati descritti polimorfismi genetici associati alle vie dell'interferone di tipo I per conferire suscettibilità. Ad esempio, il DNA a doppio filamento e gli autoanticorpi anti-Ro sono stati associati a un certo aplotipo del fattore di regolazione dell'interferone 5 del fattore di trascrizione (IRF5). L'aplotipo ha anche previsto livelli elevati di IFN- α nel siero di pazienti affetti da LES [Niewold et al., Ann. Rheum. Dis., 71(3):463-8 (2012)]. Livelli più elevati di IFN- α sono stati correlati con una maggiore estensione del coinvolgimento di più organi nei pazienti con LES [Bengtsson et al., Lupus, 9 (9): 664-71 (2000)]. Inoltre, la cosiddetta "firma dell'interferone" sembra essere prominente in LES. La firma dell'interferone rappresenta un modello di espressione di mRNA di geni inducibili dall'interferone. Una firma di interferone di tipo I si trova in più della metà dei pazienti affetti da LES ed è

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 0381-041R

associata a una maggiore attività della malattia [Baechler et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 100(5):2610-5 (2003)]. Gli anticorpi monoclonali IFN- α sono ora entrati nelle cliniche e i risultati della fase 1 di sifalimumab e rontalizumab hanno dimostrato una riduzione dose-dipendente della firma IFN di tipo I nel
5 sangue intero dei pazienti affetti da LES [McBride et al., Arthritis Rheum., 64 (11): 3666-76 (2012); Yao et al., Arthritis Rheum., (6): 1785-96 (2009)]. Sono stati sviluppati indici validati per la valutazione dell'attività della malattia e della gravità della malattia (ad esempio, moderata, grave) (si veda, ad esempio, Gladman, Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus, Curr.
10 Opin. Rheumatol., 8: 430-437 (1996); Kalunian et al., Definition, classification, activity and damage indices. In: Dubois' lupus erythematosus. 5a edizione, Baltimora: Williams e Wilkins; pp. 19-30 (1997)].

La sclerosi sistemica o la sclerodermia sistemica è una malattia autoimmune sistemica o una malattia sistemica del tessuto connettivo che è un
15 sottotipo di sclerodermia. È caratterizzato dalla deposizione di collagene nella pelle e, meno comunemente, nei reni, nel cuore, nei polmoni e nello stomaco. Il rapporto tra femmina e maschio per questa malattia è di 4: 1. L'età massima di insorgenza della malattia è compresa tra 30-50 anni.

La psoriasi è una patologia autoimmune che colpisce la pelle. Si verifica
20 quando il sistema immunitario confonde le cellule della pelle come un agente patogeno e invia segnali difettosi che accelerano il ciclo di crescita delle cellule della pelle. La psoriasi è stata collegata a un aumentato rischio di ictus e il trattamento di livelli elevati di lipidi nel sangue può portare a un miglioramento. i sono cinque tipi di psoriasi: a placche, guttata, inversa, pustolosa ed
25 eritrodermica. La forma più comune, la psoriasi a placche, è comunemente

vista come colorazioni rosse e bianche di macchie squamose che appaiono sul primo lato superiore dell'epidermide. Tuttavia, alcuni pazienti non presentano segni o sintomi dermatologici.

L'artrite reumatoide è una malattia infiammatoria cronica che colpisce
5 molti tessuti e organi, ma attacca principalmente le articolazioni flessibili. Il processo prevede una risposta infiammatoria della capsula attorno alle articolazioni secondaria a gonfiore delle cellule sinoviali, eccesso di liquido sinoviale e sviluppo del tessuto fibroso (pannus) nel sinovia. La patologia del processo patologico porta spesso alla distruzione della cartilagine articolare e
10 all'anchilosi delle articolazioni. L'artrite reumatoide può anche produrre infiammazione diffusa nei polmoni, membrana attorno al cuore (pericardio), membrane polmonari (pleura) e bianco dell'occhio (sclera), nonché lesioni nodulari, più comuni nel tessuto sottocutaneo. Sebbene la causa dell'artrite reumatoide sia sconosciuta, l'autoimmunità svolge un ruolo fondamentale sia
15 nella sua cronicità che nella sua progressione e l'AR è considerata una malattia autoimmune sistemica. Nei pazienti con artrite è stata osservata un'espressione eccessiva di TNF α e altre citochine proinfiammatorie [Feldmann et. al., Prog Growth Factor Res., 4: 247-55 (1992)]. Inoltre, gli animali transgenici che esprimono il TNF α umano sviluppano una poliartrite erosiva con molte
20 caratteristiche associate alla malattia [Keffer et. al., EMBO J., 10 (13): 4025-31 (1991)]. L'analgesia e i farmaci antinfiammatori, compresi gli steroidi, vengono utilizzati per sopprimere i sintomi, mentre i farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARD) sono necessari per inibire o arrestare il processo immunitario sottostante e prevenire danni a lungo termine. Più recentemente, la terapia
25 anticorpale anti-TNF α (Rituximab) è stata utilizzata per gestire la malattia [

Edwards, et. al., N. Engl. J. Med., 350 (25): 2572-81 (2004)].

La malattia infiammatoria intestinale (IBD) è un gruppo di condizioni infiammatorie del colon e dell'intestino tenue. I principali tipi di IBD sono la malattia di Crohn e la colite ulcerosa (UC). La principale differenza tra il morbo di Crohn e la UC è la posizione e la natura dei cambiamenti infiammatori: il morbo di Crohn può interessare qualsiasi parte del tratto gastrointestinale, dalla bocca all'ano (saltare le lesioni), sebbene la maggior parte dei casi inizi nell'ileo terminale; mentre UC è limitata al colon e al retto. A seconda del livello di gravità, l'IBD può richiedere immunosoppressione per controllare il sintomo, come prednisone, inibizione del TNF, azatioprina (Imuran), metotrexato o 6-mercaptopurina. Più comunemente, il trattamento dell'IBD richiede una forma di mesalazina.

La dermatomiosite (DM) è un tipo di malattia del tessuto connettivo autoimmune correlata alla polimiosite (PM) che è caratterizzata da infiammazione dei muscoli e della pelle. Mentre la DM colpisce più frequentemente la pelle e i muscoli, è un disturbo sistemico che può interessare anche le articolazioni, l'esofago, i polmoni e, meno comunemente, il cuore.

La polimiosite (PM) ("infiammazione di molti muscoli") è un tipo di infiammazione cronica dei muscoli (miopatia infiammatoria) correlata alla dermatomiosite e alla miosite del corpo di inclusione.

Il diabete di tipo I è una forma di diabete mellito che deriva dalla distruzione autoimmune delle cellule beta del pancreas che producono insulina. La successiva mancanza di insulina porta a un aumento del glucosio nel sangue e nelle urine. I sintomi classici sono poliuria, polidipsia, polifagia e perdita di peso.

Inghes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 03BM-041R

Esempi di altre malattie adatte per il trattamento con anticorpi anti-BDCA2 descritti nel presente contesto includono asma, morbo di Behcet, sindrome di CREST, morbo di Crohn, dermatomiosite, dermatomiosite giovanile, diabete mellito, lupus eritematoso discoide, fibrosi polmonare, glomerulonefrite autoimmune, glomerulopatia membranosa, artrite reumatoide giovanile (artrite cronica giovanile), malattia del tessuto connettivo misto, sclerosi multipla, sindrome nefrosica, pannicolite, pemfigoide, pemfigo, pemfigo eritematoso, pemfigo foliaceo, pemfigo vulgaris, polimialgia reumatica, sclerosi sistemica, sclerosi sistemica progressiva (sclerodermia), morfea (sclerodermia localizzata), sclerosi multipla, psoriasi, artrite psoriasica, fibrosi polmonare, fenomeno/sindrome di Raynaud, sindrome di Sjogren e colite ulcerosa.

A un soggetto a rischio, diagnosticato o che presenta uno di questi disturbi può essere somministrato un anticorpo anti-BDCA2 in quantità e per un certo periodo per fornire un effetto terapeutico globale. L'anticorpo anti-BDCA2 può essere somministrato da solo (monoterapia) o in combinazione con altri agenti (terapia combinata). In una forma di realizzazione, l'agente per l'uso in terapia di combinazione con un anticorpo anti-BDCA2 qui descritto è un agente antimalarico. In una forma di realizzazione, l'agente per l'uso in terapia combinata con un anticorpo anti-BDCA2 qui descritto è un inibitore di segnalazione di TLR7 e/o TLR9. In un'altra forma di realizzazione, l'agente per l'uso in terapia di combinazione con un anticorpo anti-BDCA2 qui descritto è un corticosteroide. In alcune forme di realizzazione, l'agente per l'uso in terapia di combinazione con un anticorpo anti-BDCA2 qui descritto è un farmaco antimalarico e/o un inibitore della chinasi (ad esempio, inibitore di BTK [ad esempio, ibrutinib (PCI-32765), AVI-292, ONO-WG-307], inibitore JAK1,

inibitore JAK2, inibitore JAK3, inibitore Tyk2). In una forma di realizzazione specifica, l'agente per l'uso in terapia combinata con un anticorpo anti-BDCA2 qui descritto è idrossiclorochina. Le quantità e i tempi di somministrazione per le terapie combinate possono essere quelli che forniscono, ad esempio, un
5 additivo o un effetto terapeutico sinergico. Inoltre, la somministrazione dell'anticorpo anti-BDCA2 (con o senza il secondo agente) può essere utilizzata come trattamento primario, ad esempio, di prima linea o come trattamento secondario, ad esempio, per soggetti che hanno una risposta inadeguata a una precedentemente somministrata terapia (vale a dire una terapia diversa da
10 quella con un anticorpo anti-BDCA2). In alcune forme di realizzazione, la terapia combinata include l'uso di un anticorpo anti-BDCA2 e uno o più dei seguenti agenti: glucocorticoide, FANS, prednisone, idrossiclorochina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, proguanile, meflochina, dapsona, primaquina, metotrexato, micofene mofetile, azatioprina, talidomide,
15 ciclofosfamida, ciclosporina A, rapamicina, prostaciclina, inibitore della fosfodiesterasi, antagonisti dell'endotelina, statina, ACE-inibitore e calcio-antagonisti. In altre forme di realizzazione, la terapia combinata include l'uso di un anticorpo anti-BDCA2 e uno o più tra: solfasalazina, doxiciclina, minociclina, penicillamina, tofacitinib e leflunomide.

20 **Composizioni farmaceutiche**

Un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene descritto nel presente contesto può essere formulato come una composizione farmaceutica per la somministrazione a un soggetto, ad esempio per trattare un disturbo descritto nel presente contesto. Tipicamente, una composizione
25 farmaceutica include un veicolo farmaceuticamente accettabile. Come usato in

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° U8BM-041R

questo contesto, "veicolo farmaceuticamente accettabile" include qualsiasi e tutti i solventi, mezzi di dispersione, rivestimenti, agenti antibatterici e antimicotici, agenti isotonici e ritardanti l'assorbimento e simili che siano fisiologicamente compatibili. La composizione può includere un sale farmaceuticamente accettabile, ad esempio un sale di addizione di acido o un sale di addizione di base [si veda, ad esempio, Berge, SM, et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19].

La formulazione farmaceutica è una tecnica ben consolidata, e viene ulteriormente descritta, ad esempio, in Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a edizione, Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7a Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); e Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3a ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Le composizioni farmaceutiche possono essere in varie forme. Queste includono, ad esempio, forme di dosaggio liquide, semisolide e solide, come soluzioni liquide (ad esempio, soluzioni iniettabili e infusibili) dispersioni o sospensioni, compresse, pillole, polveri, liposomi e supposte. La forma preferita può dipendere dalla modalità di somministrazione e dall'applicazione terapeutica desiderate. Tipicamente le composizioni per gli agenti qui descritti sono sotto forma di soluzioni iniettabili o non infusibili.

In una forma di realizzazione, un anticorpo anti-BDCA2 descritto nel presente contesto è formulato con materiali eccipienti, come cloruro di sodio, citrato di sodio, fosfato dibasico eptaidrato, fosfato monobasico di sodio, Tween-80 e uno stabilizzatore. Può essere fornita, ad esempio, in una

soluzione tamponata a una concentrazione adatta e può essere conservato a 2-8 °C. In alcune altre forme di realizzazione, il pH della composizione è compreso tra circa 5,8 e 6,6 (ad esempio 5,8, 5,9, 6,0, 6,1,6,2,6,3,6,4,6,5,6,6).

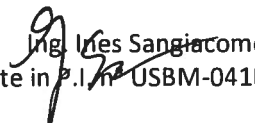
Le composizioni farmaceutiche possono anche includere agenti che
5 riducono l'aggregazione dell'anticorpo BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene quando formulato. Esempi di agenti riducenti dell'aggregazione includono uno o più amminoacidi selezionati dal gruppo costituito da metionina, arginina, lisina, acido aspartico, glicina e acido glutammico. Questi amminoacidi possono essere aggiunti alla formulazione a una concentrazione da circa 0,5
10 mM a circa 145 mM (ad esempio 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM). Le composizioni farmaceutiche possono anche includere uno zucchero (ad esempio saccarosio, trealosio, mannitolo, sorbitolo o xilitolo) e/o un modificatore di tonicità (ad esempio cloruro di sodio, mannitolo o sorbitolo) e/o un tensioattivo (ad esempio polisorbato-20 o polisorbato-80).

15 Tali composizioni possono essere somministrate per via parenterale (ad esempio Iniezione endovenosa, sottocutanea, intraperitoneale o intramuscolare). In un caso, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene di tali composizioni vengono somministrati per via sottocutanea. In un caso, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene di tali
20 composizioni vengono somministrati per via endovenosa. Le espressioni "somministrazione parenterale" e "somministrata per via parenterale" come utilizzate nel presente contesto si riferiscono a modalità di somministrazione diverse dalla somministrazione enterale e topica, solitamente mediante iniezione, e includono, senza limitazioni, infusione e iniezione endovenosa,
25 intramuscolare, intra-arteriosa, intratecale, intracapsulare, intraorbitale,

intracardiaca, intradermica, intraperitoneale, transtracheale, sottocutanea, sottocuticolare, intra-articolare, subcapsulare, subaracnoidea, intraspinale, epidurale e intrasternale.

La composizione può essere formulata come soluzione, microemulsione, dispersione, liposoma o altra struttura ordinata adatta per la conservazione stabile ad alta concentrazione. Possono essere preparate soluzioni iniettabili sterili mediante incorporazione dell'agente descritto nel presente contesto nella quantità necessaria in un solvente appropriato, con un ingrediente o una combinazione di ingredienti enumerati sopra, secondo necessità, seguita da sterilizzazione con filtro. Generalmente, le dispersioni sono preparate mediante incorporazione di un agente descritto nel presente contesto in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basico e gli altri ingredienti necessari tra quelli enumerati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione preferiti sono l'essiccazione sottovuoto e la crioessiccazione, che produce una polvere di un agente descritto nel presente contesto più qualsiasi ingrediente aggiuntivo desiderato da una sua soluzione precedentemente sottoposta a filtraggio sterile. La corretta fluidità di una soluzione può essere mantenuta, ad esempio, mediante l'uso di un rivestimento come la lecitina, mediante il mantenimento della granulometria necessaria in caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. L'assorbimento prolungato di composizioni iniettabili può essere determinato includendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, ad es. sali monostearati e gelatina.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene possono essere preparati con un veicolo che


Ing. Ives Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

proteggerà il composto dal rilascio rapido, come una formulazione a rilascio controllato, inclusi impianti e sistemi di rilascio microincapsulati. Possono essere utilizzati polimeri biocompatibili, biodegradabili, come etilenvinilacetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri e acido polilattico. Molti
5 metodi per la preparazione di tali formulazioni sono brevettati o generalmente noti. Si veda, ad esempio Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

In una forma di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene (ad esempio
10 B11B059) a una concentrazione da circa 0,5 mg/mL a 300 mg/mL (ad esempio 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL, 175 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL), formulato con citrato di sodio, cloruro di sodio e opzionalmente Tween-80 (0,01-0,1%, ad esempio 0,03%, 0,05% o 0,7%). Il pH della formulazione può essere tra 5,5 e 7,5 (ad
15 esempio 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2 6,3, 6,4 6,5, 6,6 6,7, 6,8, 6,9 7,0, 7,1, 7,3).

Somministrazione

L'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene possono essere somministrati a un soggetto, ad esempio un soggetto che ne ha
20 bisogno, ad esempio un soggetto umano, con una varietà di metodi. Per molte applicazioni, la via di somministrazione è una delle seguenti: iniezione endovenosa o infusione (IV), iniezione sottocutanea (SC), intraperitoneale (IP) o iniezione intramuscolare. È anche possibile utilizzare il rilascio intra-articolare. Possono essere utilizzate anche altre modalità di somministrazione parenterale.
25 Esempi di tali modalità includono: iniezione intraarteriosa, intratecale,

frammento legante l'antigene in una composizione è prevalentemente in forma monomerica, ad esempio almeno circa 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 98,5% o 99% in forma monomerica. Determinati anticorpi anti-BDCA2 o loro frammenti che si legano all'antigene possono comprendere meno di circa 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 5 0,3 o 0,1% di aggregati, come rilevato, ad esempio, da UV a A280 nm. Determinate composizioni di anticorpi anti-BDCA2 o loro frammenti leganti l'antigene comprendono meno di circa 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2 o 0,1% di frammenti, come rilevato, ad esempio, da UV a A280 nm.

La forma unitaria di dosaggio o "dose fissa" come qui utilizzata si 10 riferisce a unità fisicamente discrete adatte come dosaggi unitari per i soggetti da trattare; ogni unità contiene una quantità predeterminata di composto attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il veicolo farmaceutico richiesto e opzionalmente in associazione con l'altro agente. Possono essere dati dosaggi singoli o multipli. In alternativa, o in 15 aggiunta, l'anticorpo può essere somministrato mediante infusione continua.

È possibile somministrare un anticorpo anti-BDCA2 o una sua dose di frammento legante l'antigene, ad esempio, a un intervallo periodico per un periodo di tempo (un ciclo di trattamento) sufficiente a comprendere almeno 2 dosi, 3 dosi, 5 dosi, 10 dosi o più, ad esempio una o due volte al giorno, o circa 20 una o quattro volte alla settimana, o preferibilmente settimanalmente, ogni due settimane (ogni due settimane), ogni tre settimane, mensilmente, ad esempio, per circa 1 a 12 settimane, preferibilmente tra 2 e 8 settimane, più preferibilmente tra circa 3 a 7 settimane e ancora più preferibilmente per circa 4, 5 o 6 settimane. I fattori che possono influenzare il dosaggio e i tempi 25 richiesti per trattare efficacemente un soggetto, includono, ad esempio, la

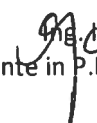
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

gravità della malattia o del disturbo, la formulazione, la via di consegna, i trattamenti precedenti, la salute generale e/o l'età del soggetto e altre malattie presenti. Inoltre, il trattamento di un soggetto con una quantità terapeuticamente efficace di un composto può includere un trattamento singolo o, preferibilmente, può includere una serie di trattamenti.

Se un soggetto è a rischio di sviluppare un disturbo immunologico qui descritto, l'anticorpo può essere somministrato prima della piena insorgenza del disturbo immunologico, ad esempio come misura preventiva. La durata di tale trattamento preventivo può essere un singolo dosaggio dell'anticorpo o il trattamento può continuare (ad esempio dosaggi multipli). Ad esempio, un soggetto a rischio per il disturbo o che ha una predisposizione al disturbo può essere trattato con l'anticorpo per giorni, settimane, mesi o persino anni in modo da prevenire l'insorgere o l'esplosione del disturbo.

Una composizione farmaceutica può includere una "quantità terapeuticamente efficace" di un agente qui descritto. Tali quantità efficaci possono essere determinate in base all'effetto dell'agente somministrato o all'effetto combinatorio degli agenti se si utilizza più di un agente. Una quantità terapeuticamente efficace di un agente può variare secondo fattori quali lo stato della malattia, l'età, il sesso e il peso del soggetto e la capacità del composto di stimolare una risposta desiderata nel soggetto, ad esempio, il miglioramento di almeno un parametro del disturbo, o il miglioramento di almeno un sintomo del disturbo. Una quantità terapeuticamente efficace è anche una in cui eventuali effetti tossici o nocivi della composizione sono superati dagli effetti terapeutici benefici.

In alcuni casi, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante


James Sangiacomo
Consulente in P.D. USBM-041R

l'antigene viene somministrato per via sottocutanea ad una concentrazione da circa 1 mg/mL a circa 300 mg/mL (ad esempio 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL, 175 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL). In un caso, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene viene somministrato per via sottocutanea a una concentrazione di 50 mg/mL. In un altro caso, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene viene somministrato per via endovenosa a una concentrazione da circa 1 mg/mL a circa 300 mg/mL. In un caso specifico, l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene viene somministrato per via endovenosa a una concentrazione di 50 mg/mL.

Dispositivi e kit per la terapia

Le composizioni farmaceutiche che includono l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene possono essere somministrate con un dispositivo medico. Il dispositivo può essere progettato con funzionalità quali portabilità, conservazione della temperatura ambiente e facilità d'uso in modo che possa essere utilizzato in situazioni di emergenza, ad esempio da un soggetto non addestrato o da personale di emergenza sul campo, rimosso da strutture mediche e altre strutture mediche attrezzature. Il dispositivo può includere, ad esempio, uno o più alloggiamenti per conservare preparazioni farmaceutiche che includono un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene e può essere configurato per erogare una o più dosi unitarie dell'anticorpo. Il dispositivo può essere ulteriormente configurato per amministrare un secondo agente, ad esempio un agente chemioterapico, sia come una singola composizione farmaceutica che include anche l'anticorpo anti-BDCA2 o suo frammento legante l'antigene o come due composizioni

farmaceutiche separate.

La composizione farmaceutica può essere somministrata con una siringa. La composizione farmaceutica può anche essere somministrata con un dispositivo di iniezione ipodermica senza ago, come i dispositivi descritti in US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Esempi di impianti e moduli ben noti includono: 4.487.603 USA, che descrive una pompa di microinfusione impiantabile per l'erogazione di farmaci a velocità controllata; US 4.486.194, che rivela un dispositivo terapeutico per la somministrazione di medicinali attraverso la pelle; 4.447.233 USA, che descrive una pompa per infusione di farmaci per erogare farmaci con una velocità di infusione precisa; 4.447.224 USA, che descrive un apparato di infusione impiantabile a flusso variabile per erogazione continua di farmaci; US 4.439.196, che descrive un sistema di somministrazione di farmaci osmotici con scomparti multi-camera; e 4.475.196 USA, che rivela un sistema di somministrazione di farmaci osmotici. Sono anche noti molti altri dispositivi, impianti, sistemi di consegna e moduli.

Un anticorpo anti-BDCA2 o un suo frammento legante l'antigene possono essere forniti in un kit. In una forma di realizzazione, il kit include (a) un contenitore che contiene una composizione che include anticorpo anti-BDCA2 e opzionalmente (b) materiale informativo. Il materiale informativo può essere descrittivo, formativo, di marketing o altro materiale relativo ai metodi qui descritti e/o all'uso degli agenti a scopo terapeutico.

In una forma di realizzazione, il kit include anche un secondo agente per il trattamento di un disturbo descritto nel presente contesto (ad esempio, inibitore BTK, un antimalarico, glucocorticoide, FANS, prednisone,

Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. USBM-041R

idrossiclorochina, amodiachina, pirimetamina, proguanile, solfonammidi, meflochina, atovaquone, primaquina, artemisinina e derivati, alofantrina, doxiciclina, clindamicina, metotrexato, micofenolato mofetile, azatioprina, ciclofosfamide, solfasalazina o leflunomide). Ad esempio, il kit include un
5 primo contenitore che contiene una composizione che include l'anticorpo anti-BDCA2 e un secondo contenitore che include il secondo agente.

Il materiale informativo dei kit non è limitato nella sua forma. In una forma di realizzazione, il materiale informativo può includere informazioni sulla produzione del composto, peso molecolare del composto, concentrazione, data
10 di scadenza, informazioni sul lotto o sul sito di produzione e così via. In una forma di realizzazione, il materiale informativo si riferisce ai metodi di somministrazione dell'anticorpo anti-BDCA2 o del suo frammento legante l'antigene, ad esempio. In una dose adatta, una forma di dosaggio o una
15 modalità di somministrazione (ad esempio una dose, una forma di dosaggio o una modalità di amministrazione qui descritta), per trattare un soggetto che ha avuto o che è a rischio di un disturbo immunologico descritto nel presente contesto. Le informazioni possono essere fornite in una varietà di formati, tra cui testo stampato, materiale leggibile da computer, registrazione video o
20 registrazione audio o informazioni che forniscono un collegamento o un indirizzo a materiale sostanziale, ad esempio su Internet.

Oltre all'anticorpo, la composizione nel kit può includere altri ingredienti, come un solvente o un tampone, uno stabilizzante o un conservante. L'anticorpo può essere fornito in qualsiasi forma, ad esempio in forma liquida, secca o liofilizzata, preferibilmente sostanzialmente pura e/o sterile. Quando gli
25 agenti vengono forniti in una soluzione liquida, la soluzione liquida

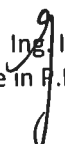
Ines Sangiacomo
Consulente in P.R. n° 21581M-041R

preferibilmente è una soluzione acquosa. Quando gli agenti sono forniti come una forma essiccata, la ricostituzione è generalmente mediante l'aggiunta di un solvente adatto. Il solvente, ad esempio acqua sterile o tampone, può essere fornito opzionalmente nel kit.

5 Il kit può includere uno o più contenitori per la composizione o le composizioni contenenti gli agenti. In alcune forme di realizzazione, il kit contiene contenitori, divisori o scomparti separati per la composizione e il materiale informativo. Ad esempio, la composizione può essere contenuta in una bottiglia, fiala o siringa e il materiale informativo può essere contenuto in
10 una busta o pacchetto di plastica. In altre forme di realizzazione, gli elementi separati del kit sono contenuti in un singolo contenitore non diviso. Ad esempio, la composizione è contenuta in una bottiglia, fiala o siringa che ha fissato al materiale informativo sotto forma di un'etichetta. In alcune forme di realizzazione, il kit include una pluralità (ad esempio una confezione) di singoli
15 contenitori, ciascuno contenente una o più forme di dosaggio unitarie (ad esempio una forma di dosaggio qui descritta) degli agenti. I contenitori possono includere un dosaggio unitario combinato, ad esempio un'unità che include sia l'anticorpo anti-BDCA2 o il suo frammento legante l'antigene e il secondo agente, ad esempio, in un rapporto desiderato. Ad esempio, il kit include una
20 pluralità di siringhe, ampolle, pacchetti di fogli, blister o dispositivi medici, ad esempio, ciascuno contenente una singola dose unitaria combinata. I contenitori dei kit possono essere ermetici, impermeabili (ad esempio, impermeabili a variazioni di umidità o evaporazione) e/o impermeabili.

Il kit include opzionalmente un dispositivo adatto per la somministrazione
25 della composizione, ad esempio una siringa o un altro dispositivo di erogazione

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R



adatto. Il dispositivo può essere fornito precaricato con uno o entrambi gli agenti o può essere vuoto, ma adatto per il caricamento.

Usi diagnostici

Gli anticorpi anti-BDCA2 o i loro frammenti leganti l'antigene possono essere utilizzati in un metodo diagnostico per rilevare la presenza di BDCA2, *in vitro* (ad esempio un campione biologico, come tessuto, biopsia) o *in vivo* (ad esempio, imaging *in vivo* in un soggetto). Ad esempio, gli anticorpi anti-BDCA2 umani o effettivamente umani possono essere somministrati a un soggetto per rilevare BDCA2 all'interno del soggetto. Ad esempio, l'anticorpo può essere etichettato, ad esempio, con un'etichetta rilevabile per MRI o una radiomarcatura. Il soggetto può essere valutato usando un mezzo per rilevare la marcatura rilevabile. Ad esempio, il soggetto può essere scansionato per valutare la localizzazione dell'anticorpo all'interno del soggetto. Ad esempio, il soggetto viene ripreso, ad esempio mediante NMR o altri mezzi tomografici.

Esempi di etichette utili per l'imaging diagnostico includono radiomarcati come ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C e ^{188}Rh , marcature fluorescenti come fluoresceina e rodamina, marcature attive di risonanza magnetica nucleare, isotopi ad emissione di positroni rilevabili da uno scanner per tomografia a emissione di positroni ("PET"), chemiluminescenti come luciferina e marcatori enzimatici come perossidasi o fosfatasi. Possono anche essere impiegati emettitori di radiazioni a corto raggio, come isotopi rilevabili da sonde per rivelatori a corto raggio. Il ligando proteico può essere etichettato con tali reagenti usando tecniche note. Ad esempio, vedi Wensel e Meares (1983) Radioimmunoimaging e radioimmunoterapia, Elsevier, New York per le tecniche relative alla marcatura radioattiva degli anticorpi e Colcher et al. (1986) Meth.

Enzymol. 121: 802-816.

Il soggetto può essere "ripreso" *in vivo* usando tecniche note come la scansione radionucleare usando ad esempio una camera gamma o una tomografia a emissione. Si veda ad esempio AR Bradwell et al., "Developments
5 in Antibody Imaging", Anticorpi monoclonali per la rilevazione e la terapia del cancro, RW Baldwin et al., (a cura di), pp 65-85 (Academic Press 1985). In alternativa, è possibile utilizzare uno scanner per tomografia transassiale a emissione di positroni, come Pet VI designato situato presso il Brookhaven National Laboratory, dove il radiomarcatore emette positroni (ad esempio ^{11}C ,
10 ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N).

Magnetic Resonance Imaging (MRI) utilizza NMR per visualizzare le caratteristiche interne del soggetto vivente ed è utile per la prognosi, la diagnosi, il trattamento e la chirurgia. La risonanza magnetica può essere utilizzata senza composti traccianti radioattivi per ovvi benefici. Alcune tecniche
15 di risonanza magnetica sono riassunte in EP0 502 814 A. Generalmente, le differenze relative alle costanti di tempo di rilassamento T1 e T2 dei protoni d'acqua in diversi ambienti vengono utilizzate per generare un'immagine. Tuttavia, queste differenze possono essere insufficienti per fornire immagini nitide ad alta risoluzione.

20 Le differenze in queste costanti di tempo di rilassamento possono essere migliorate dagli agenti di contrasto. Esempi di tali agenti di contrasto includono un numero di agenti magnetici, agenti paramagnetici (che alterano principalmente T1) e agenti ferromagnetici o superparamagnetici (che alterano principalmente la risposta T2). I chelati (ad esempio EDTA, DTPA e NTA
25 chelati) possono essere usati per attaccare (e ridurre la tossicità) di alcune

sostanze paramagnetiche (ad esempio Fe^{3+} , Mn^{2+} , Gd^{3+}). Altri agenti possono essere sotto forma di particelle, ad esempio da meno di 10 μm a circa 10 nm di diametro). Le particelle possono avere proprietà ferromagnetiche, anti-ferromagnetiche o superparamagnetiche. Le particelle possono includere, ad esempio, magnetite (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferriti e altri composti minerali magnetici di elementi di transizione. Le particelle magnetiche possono includere uno o più cristalli magnetici con e senza materiale non magnetico. Il materiale non magnetico può comprendere polimeri sintetici o naturali (come separamio, destrano, destrina, amido e simili).

10 Gli anticorpi anti-BDCA2 o i loro frammenti leganti l'antigene possono anche essere marcati con un gruppo indicante contenente l'atomo ^{19}F attivo NMR, o una pluralità di tali atomi in quanto (i) sostanzialmente tutti gli atomi di fluoro naturalmente abbondanti sono l'isotopo ^{19}F e, quindi, sostanzialmente tutti i composti contenenti fluoro sono NMR-attivi; (ii) molti composti polifluorurati chimicamente attivi come l'anidride trifluoracetica sono disponibili
15 in commercio a costi relativamente bassi e (iii) molti composti fluorurati sono stati trovati clinicamente accettabili per l'uso negli esseri umani come i polimeri perfluorurati utilizzati per trasportare ossigeno come sostituti dell'emoglobina. Dopo aver concesso tale tempo per l'incubazione, viene eseguita una risonanza
20 magnetica di tutto il corpo usando un apparato come uno di quelli descritti da Pykett (1982) Scientific American, 246: 78-88 per individuare e immagini la distribuzione BDCA2.

 In un altro aspetto, la descrizione fornisce un metodo per rilevare la presenza di BDCA2 in un campione *in vitro* (ad esempio, un campione
25 biologico, come siero, plasma, tessuto, biopsia). Il metodo soggetto può essere

Ing. Giuseppe Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 05BM-041R

utilizzato per diagnosticare un disturbo, ad esempio un disturbo autoimmune (ad esempio SLE) o a per rilevare i livelli di pDC in un campione. Il metodo include: (i) mettere a contatto il campione o un campione di controllo con l'anticorpo anti-BDCA2; e (ii) valutare il campione per la presenza di BDCA2, ad esempio, rilevando la formazione di un complesso tra l'anticorpo anti-BDCA2 e BDCA2 o rilevando la presenza dell'anticorpo o BDCA2. Ad esempio, l'anticorpo può essere immobilizzato, ad esempio su un supporto e viene rilevata la ritenzione dell'antigene sul supporto, e/o viceversa. L'anticorpo utilizzato può essere marcato ad esempio con un fluoroforo. È possibile includere un campione di controllo. Il controllo positivo può essere un campione noto per la valutazione della malattia o del disturbo e un controllo negativo può essere un campione di un soggetto che non ha la malattia o il disturbo in fase di valutazione. Una variazione statisticamente significativa nella formazione del complesso nel campione rispetto al campione di controllo può essere indicativa della presenza di BDCA2 nel campione. Generalmente, un anticorpo anti-BDCA2 può essere utilizzato in applicazioni che includono polarizzazione della fluorescenza, microscopia, ELISA, centrifugazione, cromatografia e selezione cellulare (ad esempio selezione cellulare attivata per fluorescenza). In determinati casi, l'anticorpo anti-BDCA2 è BIIB059 o clone dendritici 124B3.13. In alcuni casi, il metodo prevede inoltre l'immunocolorazione di un campione di tessuto con un anticorpo anti-CD 123. Il campione di tessuto può essere, ad esempio, biopsie cutanee di pazienti umani con condizioni autoimmuni, ad esempio LES.

I seguenti sono esempi della pratica dell'invenzione. Non devono essere interpretati come limitativi dell'ambito dell'invenzione in alcun modo.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

ESEMPI

I seguenti esempi sono forniti per illustrare meglio l'invenzione rivendicata e non devono essere interpretati come limitanti l'ambito dell'invenzione. Nella misura in cui sono menzionati materiali specifici, è solo a
5 scopo illustrativo e non intende limitare l'invenzione. Un esperto nella tecnica può sviluppare mezzi o reagenti equivalenti senza l'esercizio di capacità inventiva e senza allontanarsi dall'ambito dell'invenzione.

Esempio 1: Clonazione delle catene pesanti e leggere dell'anticorpo anti-BDCA2 murino

10

L'ibridoma murino 24F4 (IgG1, kappa) è stato derivato da un topo Balb/c immunizzato da Gene Gun con il plasmide pEAG2456, un vettore di espressione di mammifero che co-esprime BDCA2 e FcεRIγcDNA umani a lunghezza intera (vedi Esempio 17).

15

L'RNA cellulare totale dalle cellule di ibridoma murino 24F4 è stato preparato utilizzando un mini kit Qiagen RNeasy seguendo il protocollo raccomandato dal produttore. I cDNA che codificano le regioni variabili delle catene pesanti e leggere sono stati clonati da RT-PCR dall'RNA cellulare totale utilizzando il kit di sintesi cDNA di GE Healthcare First Strand seguendo il
20 protocollo raccomandato dal produttore utilizzando esameri casuali per l'innesco.

Per l'amplificazione della PCR dei domini variabili delle immunoglobuline murine con sequenze di segnali intatti, un cocktail di primer diretti degenerati che si ibridizzano con sequenze multiple di segnali della famiglia genica delle
25 immunoglobuline murine e un singolo primer posteriore specifico per l'estremità

5' del dominio costante murina come descritto in Current Protocols in Immunology (Wiley e Sons, 1999) erano abituati. Il dominio variabile della catena pesante 24F4 è stato amplificato con i seguenti primer: 5' ACT AGT CGA CAT GRA CTT TGG GYT CAG CTT GRT TT 3' (R=A/G e Y=C/T) (**SEQ ID NO:25**) e 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (R=A/G e Y=C/T) (**SEQ ID NO:26**). Il dominio variabile della catena leggera 24F4 con la sua sequenza di segnali è stato amplificato con i seguenti primer: 5' ACT AGT CGA CAT GGA GWC AGA CAC ACT CCT GYT ATG GGT 3' (W=A/T e Y=C/T) (**SEQ ID NO: 27**) e 5' GCG TCT AGA ACT GGA TGG TGG GAG ATG GA 3'(**SEQ ID NO:28**).

I prodotti PCR sono stati purificati con gel usando un kit di estrazione con gel Qiagen Qiaquick secondo il protocollo raccomandato dal produttore. I prodotti purificati per PCR sono stati subclonati nel vettore pCR2.1TOPO di Invitrogen usando il loro kit di clonazione TOPO seguendo il protocollo raccomandato dal produttore. Insetti da più subcloni indipendenti sono stati sequenziati per stabilire una sequenza di consenso (dal clone a catena pesante designato pYL647 e dal clone a catena leggera pYL651).

La variazione nelle sequenze tra i cloni era coerente con le posizioni di degenerazione dei primer. L'analisi BLAST delle sequenze di domini variabili ha confermato la loro identità di immunoglobuline. Le sequenze N-terminali dedotte della luce pesante e della catena pesante corrispondono a quelle delle autentiche catene 24F4 derivate dai dati di degradazione di Edman. Le masse intatte dedotte da sequenze ipotetiche riunite aggiungendo sequenze di dominio costante dedotte da Balb/c IgG1 a catena pesante e cDNA a catena leggera kappa alle sequenze di dominio variabile maturo dedotte erano coerenti con

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 058M-041R

quelle della 24F4 derivata da ibridoma purificato determinata mediante spettroscopia di massa.

Il dominio variabile a catena pesante murina 24F4 (VH) è un membro del sottogruppo murino III (D). La sequenza del dominio variabile della catena pesante murina 24F4 con CDR H1, CDR H2 e CDR H3 sottolineata in questo
5 ordine è mostrata di seguito:

```
1 DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLWVAT  
51 ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYCTR  
101 IYYNYGAWFA YWGQGLVTV SA (SEQ ID NO:29)
```

Il dominio variabile a catena leggera 24F4 murina (VL) è un membro del
10 sottogruppo murino kappa III. La sequenza del dominio variabile della catena leggera matura 24F4 murina con CDR L1, CDR L2 e CDR L3 sottolineata in questo ordine è mostrata di seguito:

```
1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSV D YDGDSYMNWY QOKPGQPPKL  
51 LIYAASSTLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQCNEDPR  
101 TFGGGKLEI K (SEQ ID NO:30)
```

15

Una cisteina non accoppiata è presente al residuo 95 nel CDRL3 nella sequenza murina 24F4 VL sopra (nella nomenclatura di Kabat questa Cys è il residuo 91).

Esempio 2. Chimerizzazione dell'anticorpo murino 24F4

20 I cDNA codificanti i domini variabili murini 24F4 sono stati usati per costruire vettori per l'espressione di chimere murine-umane (ch24F4) in cui le regioni variabili mu24F4 erano collegate alle regioni umane IgG1 e kappa costanti.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 238M-041R

I domini variabili sono stati inizialmente progettati dalla PCR per aggiungere una sequenza Kozak 5' e per introdurre sequenze umane e nuovi siti di restrizione nelle giunzioni di dominio FR4/ costante per la fusione in domini costanti di immunoglobuline umane. Le sequenze di cDNA a regione
5 variabile nei plasmidi risultanti sono state confermate dal sequenziamento del DNA. Il dominio variabile della catena pesante in plasmide pYL647 è stato utilizzato come modello per PCR con i primer 5' GAT CCG CGG CCG CAC CAT GGA CTT TGG GTT CAG CTT G 3' (SEQ ID NO:31) (addiziona il sito *Not* I e la sequenza Kozak) e 5 'GAT GGG CCC TTG GTG GAA GCT GCA GAG
10 ACA GTG ACC AGA G 3' (SEQ ID NO: 32) (aggiunge sequenze CH1 IgG1 umane a FR4/giunzione di dominio costante e un sito *Apa* I), amplificando un frammento di 0,45 kb che è stato purificato e clonato nel vettore di clonazione Invitrogen pCRBluntITOPO, generando pYL668. Per la costruzione della chimera d catena pesante, il frammento *Not*I-*Apa* I da 0,45 kb del costruito a
15 dominio variabile della catena pesante 24F4 pYL668 e il frammento *Apa*I-*Bam* HI da 0,98 kb da pEAG1325 (un plasmide contenente una costante di catena pesante hulgG1 confermata in sequenza il cDNA di dominio (con il residuo di lisina C-terminale IgG1 rimosso geneticamente) è stato subclonato nella spina dorsale vettoriale del vettore di espressione pV90 (in cui l'espressione genetica
20 eterologa è controllata da un promotore CMV-IE e da un segnale di poliadenilazione dell'ormone umano della crescita e che trasporta un *dhfr* marcatore selezionabile, si veda il brevetto US 7.494.805), per produrre il vettore di espressione pYL672. La sequenza di cDNA a catena pesante nel plasmide risultante pYL672 è stata confermata dal sequenziamento del DNA. Di
25 seguito è mostrata la sequenza proteica di catena pesante dedotta ch24F4-

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-04 IR

hulgG1 codificata da pYL672:

```
1 DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLEWVAT
51 ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGLTVTV SAASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPVAVLQ SGLYSLSSV VTPSSSLGT
201 QTYICNVNKH PSNTKVDKVV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
251 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
301 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
351 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP
401 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
451 G (SEQ ID NO: 33)
```

5 Una forma di funzione di effettore aglicosile bassa di ch24F4 è stata anche costruita sottoponendo il frammento 0,45 kb *Not I-Apa I* dal costruito a dominio variabile della catena pesante 24F4 pYL668 e il frammento *Apal-Bam HI* da 0,98 kb da pEAG2412 (un plasmide contenente un cDNA di dominio costante a catena pesante ibrida S228P/N299Q confermato hulgG4/IgG1 con

10 residuo di lisina C-terminale di IgG1 rimosso geneticamente) sono stati subclonati nella spina dorsale vettoriale del vettore di espressione pV90, generando plasmide pYL670. La sequenza di cDNA a catena pesante nel plasmide risultante pYL670 è stata confermata dal sequenziamento del DNA. Di seguito è mostrata la sequenza di proteine della catena pesante ibrida dedotta

15 agly ch24F4-hulgG4/G1 codificata da pYL670:

```
1 DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLEWVAT
51 ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGLTVTV SAASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPVAVLO SGLYSLSSV VTPSSSLGT
201 KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPV VTCVVVDVSDQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFQS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK ARGQPREPQV
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESENGQPE NNYKTTTPPVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO: 34)
```

Il dominio variabile della catena leggera kappa in plasmide pYL651 è stato utilizzato come modello per PCR con i primer 5' GAT CCG CGG CCG CCA CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TG 3' (SEQ ID NO: 35) (aggiunge un

5 ' Not I il sito e la sequenza Kozak) e 5' CCA CCG TAC GTT TGA TTT CCA
GCT TGG TGC 3' (SEQ ID NO: 36) (aggiunge sequenze di domini costanti
kappa umani su giunzione FR4/dominio costante e un sito WI 3 ' Bsi),
amplificando un frammento di 0,4 kb che è stato purificato e subclonato nel
5 vettore di clonazione Invitrogen pCRBluntITOPO, generando pYL669. Le
sequenze di cDNA a regione variabile nel plasmide pYL669 sono state
confermate dal sequenziamento del DNA. Per la costruzione della chimera della
catena leggera, il frammento di dominio variabile della catena leggera *Non I-Bsi*
WI da 0,4 kb da pYL669 e il frammento WI -*Bam* HI da 0,34 kb *Bsi* dal plasmide
10 pEAG1572 (contenente un dominio costante di catena leggera kappa umana
confermata in sequenza cDNA) sono stati subclonati nella spina dorsale
vettoriale di pV100 (in cui l'espressione genica eterologa è controllata da un
promotore CMV-IE e un segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita
umano e che trasporta un marcatore selezionabile dalla neomicina), per
15 produrre il vettore di espressione pYL671. La sequenza di cDNA di catena
leggera nel plasmide risultante pYL671 è stata confermata dal sequenziamento
del DNA. Di seguito è mostrata la sequenza di proteine della catena leggera
kappa umana dedotta ch24F4 codificata da pYL671:

```
1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGD SYMNWY QQKPGQPPKL
51 LIYAASTLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQCNEDPR
101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL SLLTLSKADY EKHK VYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:37)
```

20 Vettori di espressione (vettori di catena pesante ch24F4 pYL670 o
pYL672 e vettore di catena leggera ch24F4 pYL671) sono stati co-trasfettati in
cellule 293-EBNA e le cellule trasfettate sono state testate per la secrezione e
la specificità degli anticorpi (vettore vuoto e un vettore mAb irrilevante clonato

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

molecolarmente celle trasfuse servite come controlli). L'analisi Western blot (sviluppata con anticorpi anti-umani pesanti e a catena leggera) di terreno condizionato ha indicato che le cellule trasfettate da ch24F4 sintetizzavano e secernevano in modo efficiente catene pesanti e leggere. Il legame diretto del FACS con il BDCA2 umano di superficie ha confermato la specificità del ch24F4. Il legame EC50 di entrambe le varianti di ch24F4 era equivalente a quello del 24F4 mAb murino mediante legame diretto alla superficie espressa BDCA2 umana mediante dosaggio FACS di titolazione per diluizione. Linee cellulari CHO stabili che secernono ch24F4-hulgG1, kappa mAb e agly ch24F4-hulgG4/G1 ibrido kappa mAb sono state prodotte per co-trasfezione con pYL672/pYL671 e pYL670/pYL671, rispettivamente.

Esempio 3. Rimozione di un residuo di cisteina non accoppiato in CDRL3 dell'anticorpo chimerico 24F4

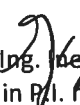
Dato che le cisteine non accoppiate in un CDR esposto possono produrre eterogeneità o instabilità del prodotto, le varianti di ch24F4 C95S e C95T sono state costruite mediante mutagenesi site-site usando il plasmide di vettore di espressione di catena leggera ch24F4 pYL671 come modello.

La mutagenesi diretta al sito è stata eseguita utilizzando il kit di mutagenesi QuikChange II di Agilent secondo il protocollo raccomandato dal produttore. La variante C95S è stata costruita utilizzando il primer mutageno 5' GCA ACC TAT TAC TGT CAA CAA AGT AAT GAG GAT CCT CGG AC 3' (SEQ ID NO: 38) e il suo complemento inverso, che ha introdotto un nuovo sito *Hin* cll, producendo plasmide pEAG2678. La variante C95T è stata costruita utilizzando il primer mutageno 5' CAA CCT ATT ACT GTC AGC AAA CTA ATG AAG ATC CTC GGA CGT TCG 3' (SEQ ID NO: 39) e il suo complemento


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

inverso, che ha rimosso un sito di *Bam* HI, producendo plasmide pEAG2679. I plasmidi mutati sono stati identificati mediante screening per le modifiche introdotte nel sito di restrizione. Le sequenze di cDNA di catena leggera a lunghezza intera nei plasmidi risultanti sono state confermate dal sequenziamento del DNA. I mAbs variante di tipo selvatico ch24F4 e C95S e C95T sono stati espressi transitoriamente in cellule 293E mediante co-trasfezione di pYL672 e pYL671, pEAG2678 o pEAG2679. Il mezzo condizionato è stato raccolto a 2 giorni dalla post-trasfezione. I titoli (analizzati da Octet su punte Fc anti-umane) di entrambe le varianti erano simili a quelli del tipo di carattere ch24F4 e le macchie occidentali di SDS-PAGE non riduttiva indicavano alcuna aggregazione lorda o clipping evidente rispetto al tipo di carattere ch24F4 mAb. Il legame diretto da FACS sulla superficie BDCA2 indicava che mentre l'EC50 apparente per il legame con la variante C95S era equivalente a quello del tipo selvaggio ch24F4, il legame EC50 della variante C95T era ridotto di diverse volte. Il mezzo condizionato contenente ch24F4 e mAb variante C95 è stato analizzato da Octet per il legame con l'ectodominio BDCA2 umano. Gli anticorpi provenienti dal mezzo condizionato da cellule transfettivamente trasfettate erano legati a punte Fc anti-umane, quindi huBDCA2 monomero scorreva sulle punte di ottetto, per esaminare il legame e la dissociazione. La cinetica di associazione e dissociazione dell'ottetto per il tipo selvaggio ch24F4 e la variante C95S erano equivalenti, mentre l'off-rate della variante C95T era più veloce di quello del tipo selvaggio ch24F4. Sulla base di questi risultati, C95S è stato incorporato nella catena leggera umanizzata CDRL3 24F4.

25 **Esempio 4. Catene pesanti e leggere 24F4 umanizzate esemplificative**

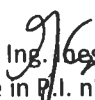
Ing.  De Santis
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Esempi di sette catene pesanti umanizzate (hu) 24F4 (huIGHV3-21 * 01 framework/24F4 VH CDR) e le loro corrispondenti sequenze di DNA sono mostrate di seguito. Le CDR 1, 2 e 3 in ciascuna catena pesante sono sottolineate in questo ordine. Le retromutazioni del framework sono mostrate in grassetto minuscolo. Le modifiche ai residui di CDR dal 24F4 murino sono mostrate dall'ombreggiatura all'interno delle sequenze di CDR. La CDR1 della catena pesante variabile (CDR H1) è definita secondo la definizione di Chothia, che è 5 amminoacidi più lunga della definizione di Kabat; i residui in corsivo nel CDR H1 identificano i 5 amminoacidi aggiuntivi [vale a dire GFTFS (SEQ ID NO: 12)] che formano il Chothia CDR H1. La maggior parte degli amminoacidi N-terminali (vale a dire acido glutammico nelle versioni H0, H1, H2 e H3 e acido aspartico nelle versioni H4, H5 e H6) del dominio della catena pesante variabile possono contattare direttamente l'antigene e influenzare l'affinità di legame. Il residuo sepolto nella posizione 49 di Kabat può influenzare la conformazione del CDR2 della catena pesante (serina nelle versioni H0, H1, H2 e H3; e alanina nelle versioni H4, H5 e H6). Il residuo nella posizione 93 di Kabat può avere un effetto sull'accoppiamento a catena per carichi pesanti (alanina nelle versioni H0, H1, H2 e H3; e treonina nelle versioni H4, H5 e H6). I residui di amminoacidi nelle regioni CDR H1, H2 e H3 che differiscono dai 24F4 murini CDR H1, H2 e H3 sono ombreggiati.

Versione

H0

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSSWRQAPGKGLEWVS~~AISSGGANV~~ADSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTVSS (SEQ ID NO: 40)
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG
ATTCAC~~TTT~~CAGTACCTATAACCATGCTTGGGTTGCGCAAGCACCGGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCCTCTGCTATTA
GTGGTAGCGGAGGTAGTACATACTATGCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
AGTCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGATTACTGTGCTCGAGATATCTACTATAA
TTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO: 41)
(pYL742)

Ing.  Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Versione

H1

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLS~~CAAS~~GFTTFSTY~~TMS~~WVRQAPGKLEWV~~ST~~ISPGDSFGYYPDSV~~Q~~GRFTISRDN~~AKN~~
SLYLQ~~MNS~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:42)
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG
ATTCAC~~TTT~~CAGTACCTATA~~CCAT~~GTCTTGGGTT~~CGCCA~~AAGCACC~~GGGCA~~AGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTA
GTCCAGGAGACAGT~~TT~~CGGATACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
AGTCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGATTACTGTGCTCGAGATATTTACTATAA
TTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:43)
(pYL743)

Versione

H2

5

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLS~~CAAS~~GFTTFSTY~~TMS~~WVRQAPGKLEWV~~ST~~ISPGDS~~ST~~YY~~AD~~SV~~Q~~GRFTISRDN~~AKN~~
NSLYLQ~~MNS~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:44)
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG
ATTCAC~~TTT~~CAGTACCTATA~~CCAT~~GTCTTGGGTT~~CGCCA~~AAGCACC~~GGGCA~~AGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTA
GTCCAGGAGACAGTAGCACTATCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACAGTCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGATTACTGTGCCCGAGATATTTACTA
TAATTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:45)
(pYL744)

Versione

H3

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLS~~CAAS~~GFTTFSTY~~TMS~~WVRQAPGKLEWV~~ST~~ISPGDSFGYYPDSV~~Q~~GRFTISRDN~~AKN~~
NSLYLQ~~MNS~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:46)
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGG
ATTCAC~~TTT~~CAGTACCTATA~~CCAT~~GTCTTGGGTT~~CGCCA~~AAGCACC~~GGGCA~~AGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTA
GTCCAGGAGACAGT~~TT~~CGGCTACTACTATCCAGACAGTGTGCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACAGTCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGATTACTGTGCCCGAGATATTTACTA
TAATTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:47)
(pYL745)

10

Versione

H4

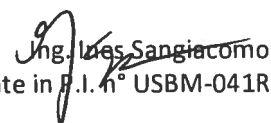
dVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLS~~CAAS~~GFTTFSTY~~TMS~~WVRQAPGKLEWV~~a~~TI~~S~~PGDSFGYYPDSV~~Q~~GRFTISRDN~~AKN~~
NSLYLQ~~MNS~~LRAEDTAVYYC~~t~~RDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:24)
GACGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGG
ATTCAC~~TTT~~CAGTACCTATA~~CCAT~~GTCTTGGGTT~~CGCCA~~AAGCACC~~GGGCA~~AGGGACTGGAGTGGGTGCAACCATTA
GTCCAGGAGACAGT~~TT~~CGGCTACTACTATCCAGACAGTGTCCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACAGTCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGATTACTGTACCCGAGATATTTACTA
TAATTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:48)
(pYL746)

Versione

H5

15

dVQLV~~q~~SGGGLV~~K~~PGGSLRLS~~CAAS~~GFTTFSTY~~TMS~~WVRQAPGKLEWV~~a~~TI~~S~~PGDSFGYYPDSV~~Q~~GRFTISRDN~~AKN~~
NSLYLQ~~MNS~~LRAEDTAVYYC~~t~~RDIYYNYGAWFAYWG~~r~~GLVTVSS (SEQ ID NO:49)
GACGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGG
ATTCAC~~TTT~~CAGTACCTATA~~CCAT~~GTCTTGGGTT~~CGCCA~~AAGCACC~~GGGCA~~AGGGACTGGAGTGGGTGCAACCATTA
GTCCAGGAGACAGT~~TT~~CGGCTACTACTATCCAGACAGTGTCCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACAGTCTGTACCTGCAAAATGAACAGGCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGATTACTGTACCCGAGATATTTACTA
TAATTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCAGAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:50)
(pYL747)


Consulente in P.I. n° USBM-041R

Versione

H6

dVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVAITISGDAVYGYSPDSVKGKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:52)
GACGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCGCGCAGCCTCTGG
ATTCACPTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGTTCCGCCAAGCACCCGGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTA
GTGGCGGAAATAACTACGGCTACTCCTATCCAGACAGTGTCAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAATGCCAAG
AACAGTCTGTACCTGCAAAATGAAC TCCCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTA
TAATTACGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:53)
(pYL748)

Di seguito è mostrato un allineamento delle sequenze di amminoacidi delle

```
H0 EVQLVESGCGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVAIS-GSGGSTY
H1 EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFG-Y
H2 EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSSTIY
H3 EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFGYY
H4 DVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVAITISPGDSFGYY
H5 EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVAITISPGDSFGYY
H6 DVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLS CAASGFTTFSTYIMSWVRQAPGKGLEWVAITISGNNYGYG
.....
```

versioni da H0 a H6:

```
H0 YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:40)
H1 YPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:42)
H2 YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:44)
H3 YPDSVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:46)
H4 YPDSVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:24)
H5 YPDSVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:49)
H6 YPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:52)
.....
```

5

Esempi di tre catene pesanti umanizzate (hu) 24F4 (huIGKV1-13 * 02 framework/24F4 VL CDR) e le loro corrispondenti sequenze di DNA sono mostrate di seguito. Le CDR 1, 2 e 3 in ciascuna catena leggera sono sottolineate in questo ordine. Ser91 (secondo la numerazione di Kabat), che è stato sostituito a Cys91 in tutte le catene leggere, è evidenziato. La maggior parte degli amminoacidi N-terminali (vale a dire l'alanina nella versione L0 e l'acido aspartico nelle versioni L1 e L2) del dominio della catena leggera variabile possono contattare direttamente l'antigene e influenzare l'affinità di legame. Le retromutazioni del framework sono mostrate in grassetto minuscolo. La prima versione (L0) contiene il minor numero di retromutazioni e la terza versione (L2) contiene il maggior numero di retromutazioni (vale a dire il meno "umanizzato").

10

15

Versione

L0

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in p.l. n° USBM-041R

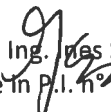
umane. Ciascuno degli anticorpi umanizzati ha una pi significativamente superiore a 7 e pertanto si prevede che abbia una carica positiva significativa a pH neutro. Ogni voce nella tabella è il valore pi calcolato dell'anticorpo combinato completo, con la carica netta tra parentesi.

Molecola	PI calcolato (costo netto)
24F4 chimerico	6,94 (-2)
H4L1 umanizzato	7,26 (0)

5 **Esempio 5. Legame di Hx/L1 a BDCA2**

Tutte le 21 possibili varianti di catene pesanti e leggere hu24F4 (descritte nell'Esempio 4) e ch24F4 sono state espresse transitoriamente in cellule 293E mediante co-trasfezione di catene pesanti e plasmidi di catene leggere. Tutte le versioni di hu24F4 sono state assemblate e secrete, con titoli superiori a quello di ch24F4 (determinati dalla quantificazione di mAb in mezzo condizionato mediante legame mediante Octet a punte Fc anti-umane). Macchie occidentali di analisi SDS-PAGE non riducenti di mAbs chimerici e umanizzati 24F4 non hanno mostrato prove di aggregazione lorda o evidente clipping rispetto a ch24F4.

15 Il mezzo condizionato è stato analizzato mediante FACS a legame diretto su cellule DG44 CHO stabilmente trasfettate che esprimono cDNA BDCA2 e FcεR1γ a lunghezza intera (macacocinomo o essere umano), (i vettori di espressione rilevanti sono BDCA2/FcεR1γ umani: pEAG2456, cyno BDCA2 FcεR1γ:pEAG2668). Nel legame diretto con la scimmia BDCA2 umana o del
20 cinomo di superficie, è stata osservata una perdita completa di legame per le serie H0, H1 e H2 di hu24F4, una significativa perdita di affinità di legame è


Ing. Pier Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

stata osservata per la serie H3 di hu24F4, una buona ritenzione di affinità per entrambi le serie H4 e H5 di hu24F4 e una moderata perdita di legame per la serie H6 di varianti hu24F4 (Figure 2 e 3). In base al titolo e ai valori apparenti di EC50 nell'analisi FACS a legame diretto, H4/L1 e H5/L1 sono stati determinati come le "migliori" varianti di hu24F4.

Il mezzo condizionato contenente ch24F4 e tutti i mAb varianti hu24F4 è stato analizzato da Octet per il legame con l'ectodominio BDCA2 umano. L'ectodominio monomero huBDCA2 è stato preparato mediante scissione proteolitica dalla proteina di fusione mulgG2a Fc-huBDCA2 purificata (plasmide rilevante: pEAG2423). Gli anticorpi provenienti dal mezzo condizionato da cellule transfettivamente trasfettate erano legati a punte Fc anti-umane, e quindi huBDCA2 monomero scorreva sulle punte di ottetto, per esaminare il legame e la dissociazione. Le serie H4 e H5 delle varianti hu24F4 hanno mostrato le migliori affinità per huBDCA2.

Nome campione	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
H6/L0	5,00E-09	2,73E+05	1,37E-03
H0/L1	9,50E-11	1,00E+05	9,50E-06
H1/L1	5,03E-11	1,00E+05	5,03E-06
H2/L1	3,35E-11	1,00E+05	3,35E-06
H3/L1	1,30E-08	4,52E+05	5,86E-03
H4/L1	7,44E-10	5,49E+05	4,08E-04
ch24F4	2,17E-09	1,61E+06	3,49E-03
Controllo 5C8	2,51E-14	1,00E+05	2,51E-09

Esempio 6. Potenzamento dell'affinità hu24F4

Per esplorare la possibilità di migliorare l'affinità hu24F4 mediante sostituzione nella posizione della cisteina non accoppiata L1 CDR L3 versione 24F4 (C95S nel vettore di espressione della catena leggera hu24F4 pYL740),
5 sono state costruite una serie di varianti della versione L1 mediante mutagenesi diretta dal sito. La retromutazione alla cisteina non accoppiata, vale a dire S95C, è stata costruita dalla mutagenesi sito-diretta producendo plasmide pYL749. Le varianti S95T, S95A e S95V sono state costruite mediante mutagenesi sito-diretta producendo plasmidi pYL750, pYL751 e pYL752,
10 rispettivamente. Le sequenze di cDNA di catena leggera a lunghezza intera nei plasmidi risultanti sono state confermate dal sequenziamento del DNA. Le varianti C95 hu24F4 mAbs sono state espresse transitoriamente in cellule 293E per co-trasfezione della catena pesante hu24F4 H4 pYL746 o hu24F4 H5 catena pesante pYL747 con varianti leggere hu24F4 L1 catene C95S pYL740,
15 S95C pYL749, S95T pYL750, S95T pYL750, S95A pYL751, o S95V pYL752 Il mezzo condizionato è stato raccolto a 2 giorni dalla post-trasfezione. I titoli (analizzati da Octet su puntali Fc anti-umani) di tutte le varianti erano simili e le macchie occidentali di SDS-PAGE non riduttiva indicavano alcuna aggregazione grossolana o clipping evidente. Il mezzo condizionato contenente
20 i mAb variante C95 è stato analizzato da Octet per il legame con l'ectodominio BDCA2 umano. Gli anticorpi provenienti dal mezzo condizionato da cellule transfettivamente trasfettate erano legati a punte Fc anti-umane, quindi huBDCA2 monomero scorreva sulle punte di ottetto, per esaminare il legame e la dissociazione. Le varianti C95A avevano gli off-rate più lenti.

Nome campione	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
---------------	-------	-----------	-----------

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Nome campione	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
24F4-H4/L1 (YL740/YL746)	5,48E-10	7,27E+05	3,98E-04
H4-L1-S95C (YL749/YL746)	2,89E-10	9,67E+05	2,79E-04
H4-L1-C95T (YL750/YL746)	3,92E-10	9,44E+05	3,70E-04
H4-L1-C95A (YL751/YL746)	2,61E-10	8,84E+05	2,30E-04
H4-L1-C95V (YL752/YL746)	3,23E-10	9,33E+05	3,01E-04

Sulla base di questi risultati, sono state prodotte linee cellulari CHO stabili per le varianti hu24F4 H4/L1 C95T e C95A e le varianti H5/L1 C95T e C95A, che presentavano le percentuali più basse apparenti più lente. Sono stati ripetuti studi di associazione Octet per mAb hu24F4 purificati. La variante hu24F4 H4/L1 C95A è stata selezionata come candidato principale. Le sequenze di plasmidi pYL746 (hu 24F4 H4 catena pesante) e pYL751 [(hu 24F4 L1 catena leggera) sono state utilizzate per la ricodifica e la costruzione di vettori di espressione per la generazione di linee cellulari di produzione CHO.

La sequenza amminoacidica a catena leggera dedotta hu24F4 L1 C95A codificata da pYL751 è mostrata di seguito (CDR L1, CDR L2 e CDR L3 sono

1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSV D YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL
 51 LIYAASTLES GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLQPEDFATY YCQQANEDPR
 101 TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV
 151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLSKADY EKHKVYACEV
 sottolineati): 201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

La sequenza amminoacidica a catena pesante dedotta hu24F4 H4-hulgG1 codificata da pYL746 è mostrata di seguito (CDR H1; CDR H2 e CDR H3 sono sottolineati):


 Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

1 DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS TYTMSWVRQA PGKGLEWVAT
51 ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGTILVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT
201 QTYICNVNHNK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
251 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
301 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE
351 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP
401 PVLDSGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
451 G (SEQ ID NO:4)

Un anticorpo costituito dalla catena pesante matura (SEQ ID NO: 4) e dalla catena leggera matura (SEQ ID NO: 3) sopra elencato è chiamato BIIB059.

5 **Esempio 7. Ricodifica dei geni di catena pesante e leggera**

Per migliorare potenzialmente l'espressione, la sequenza nucleotidica dei geni della catena leggera e pesante è stata ricodificata senza cambiare la sequenza degli amminoacidi. Di seguito è mostrata la sequenza di DNA modificata per il gene della catena leggera anti-BDCA2. Gli amminoacidi 1-240
10 contengono la sequenza di catena leggera. Gli amminoacidi 1-22 (nucleotidi in minuscolo) contengono il peptide nativo del segnale di catena leggera. Il terminale N maturo inizia con l'amminoacido 23 (D).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

```
1 atg gag atg agg gtc ccc gct cag ctg ctg ggg ctg ctt ctg ctg tgg ctg cct gga gca cga tgt
1> M D M R V P A Q L L G L L L L W L P G A R C

67 GAC AIT CAG CTG ACC CAA TCT CCA TCC TCT TTG TCC GCC TCT GTG GGG GAC AGG GTC ACC ATC ACC
23> D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T

123 TGC AAG CCC AGC CAA AGT GGT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA
45> C K A S Q S V D Y D G D S Y M N W Y Q Q K P

199 GGG AAG GGT CCC AAA CTC CTC ATC TAC GCT GCA TCC ACT CTC GAG TCT GGG GTC CCA TCC AGG TTT
67> G K A P K L L I Y A A S T L E S G V P S R F

265 AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACA ATC AGC TCA CTC CAG CCA GAG GAT TTC GCA
89> S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A

331 ACC TAT TAC TGT CAA CAA GCC AAC GAA GAT CCT CGG ACC TTC GGT CAG GGC ACC AAA GTG GAA ATC
111> T Y Y C Q Q A N E D P R T F G Q G T K V E I

397 AAG CGG ACC GTC GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCT CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA
133> K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G

463 ACT GCC TCT GGT GGG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTG CAG TGG AAG GTG
155> T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W F V

529 GAT AAC GCC CTC CAA TCT GGC AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC
177> D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T

595 TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GGC TGC
199> Y S L S S T L T L S K A D Y E K E K V Y A C

661 GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCT CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA (SEQ ID
NO: 60)
221> E V T H Q G L S S P V T K S P H R G E Q * (SEQ ID
NO: 61)
```

La sequenza di DNA modificata per il gene della catena pesante anti-BDCA2 è mostrata di seguito. Gli amminoacidi 1-470 contengono la sequenza di catena pesante. Gli amminoacidi 1-19 (nucleotidi in minuscolo) contengono il peptide nativo del segnale di catena pesante. Il terminale N maturo inizia con

l'amminoacido 20 (D).

1 atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtl gct acc cgg gtc ctg tcc GAC GTC CAG
1> **M G W S L I L L F L V A V A T R V L S** D V Q

67 CTG STG GAG TCT GGG GGA GGC CTG GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGC GCA GCC TCT
23> L V E S G G G L V K P G G S L R I S C A A S

133 GGA TTC ACT TTC AGT ACC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCA CCT GGC AAG GGA CTG GAG TGG
45> G F T F S T Y T M S W V R Q A P G K G L E W

199 GTC GCA ACC ATT AGT CCA GGA GAC AGT TTC GGC TAC TAC TAT CCA GAC AGT GTC CAG GGC CGA TTC
67> V A T I S P G D S F G Y Y Y P D S V Q E R F

265 ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AGT CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGG GCA GAG GAC
89> T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D

331 ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC CGA GAT ATT TAC TAT AAT TAC GGA GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC
111> T A V Y Y C T R D I Y Y N Y G A W F A Y W G

397 CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT AGC GGT TCC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCA CCC
133> Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A F

463 TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCT GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA
155> S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E

529 CCC STG ACC STG TCC TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAG ACC TTC CCC GCT GTC CTG
177> P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L

595 CAA TCC TCA GCA CTC TAC TCC CTC TCC AGC GTC GTC ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

199> G S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
661 ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA
221> T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K
72/ TCT TGT GAC AAG ACT CAC ACA TGC CCA CCT TGC CCA GCA CCT CAA CTC CTG GGG GGA CCI TCA GTC
243> S C D K T H T C P P C P A P E L L G C P S V
793 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG
265> F L F F F K P K D T L K I S R T F E V T C V
858 GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAT GTT GAC GGC GTG GAG GTC
287> V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
925 CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCT CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACC TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC
309> H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L
991 ACC GTC CTG CAC CAA GAG TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC
331> T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L
1057 CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
353> P A P I E K T I S K A K G Q P R E F Q V Y T
1123 CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAA GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC
375> L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F
1189 TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAC TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCT GAG AAC AAC TAG AAG ACC ACA
397> Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1255 CCT CCC GTG TTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC TCC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG
419> P P V L D S D S S F F L Y S K L T V D K S R
1321 TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG
441> W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
1387 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCC GGT TGA (SEQ ID NO:62)
463> K S L S L S P G + (SEQ ID NO:63)

Esempio 8. Cassette e vettori di espressione

Ing.  Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

Il gene della catena pesante e i geni della catena leggera sono stati recisi e legati in vettori di espressione separati. Ogni gene è sotto controllo trascrizionale del promotore immediato precoce del citomegalovirus umano e della sequenza di poliadenilazione del gene dell'ormone della crescita umano.

5 Il plasmide che esprime la catena leggera, pJP009, contiene anche una cassetta di espressione per il gene della neomicina fosfotransferasi (neo) contenente il promotore precoce murino fosfoglicerato chinasi (muPGK) e la sequenza di poliadenilazione muPGK (Figura 4). Il plasmide che esprime la catena pesante, pJP010, contiene anche una cassetta di espressione per il
10 gene *dhfr* che è stata utilizzata come marcatore selezionabile e amplificabile con metotrexato. Le caratteristiche principali dei plasmidi pJP009 e pJP010 sono riassunte di seguito.

Nome plasmide	Promotori	Peptide di segnalazione	Catena polipeptidica matura	Poliadenilazione	Marcatori selezionabili
pJP009	hCMV IE muPGK	Sottogruppo kappa umano nativo I	Catena leggera 218 aa	hGH muPGK	Neomicina fosfotransferasi: (G418) beta-lattamasi: (ampicillina)
pJP010	hCMV IE SV40E	Sequenza peptidica di segnalazione sintetica	Catena pesante 451 aa	hGH SV40E	DHFR: (alfa-nucleosidi) beta-lattamasi: (ampicillina)

Abbreviazioni: citomegalovirus umano immediato precoce (hCMV IE), virus di scimmia precoce 40 (SV40E), fosfoglicerato chinasi murino (muPGK), ormone della crescita umano (hGH), gene della neomicina fosfotransferasi (*resistenza G418*), gene diidrotolato reduttasi (gene *dhfr*) per resistenza all'ampicillina (beta-lattamasi).

La sequenza nucleotidica completa del plasmide pJP009 è mostrata di

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. J. n° USBM-041R

seguito. LE tre cornici di lettura aperte sono la catena leggera 24F4, la
neomicina fosfotransferasi e la beta-lattamasi.

```
1  TTGACATTGATTATAGCACTAGTATTAAATACAAATCAATTACGGGGICAPPAGTTCATAGCCCAATATAGGACTTCGGCGTACATRACTTA
93  CGGTAARTGGCCGGCTGGCTGACCGGCCAAGACCCCGGCCAATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCAATASIAACGCCAATAGGGACT
185  TCCCATTTGACGTCAAAGGGTGGAGTATTTACGGPAAACTGCCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATGATATGCCAAGTACGCCCGCTATTGA
277  CGTCAATGACGGTAAATGCCCCGCTGGCATTTGCCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCCTAGCTATAGTCA
369  TCGCTATTACCATTGGTGAAGCGGCTTTGGCAGTACATCAATGGGGCTGGATAGCGGTTGGACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCAAT
461  GACGTCATGSSAGTGTGTTTTSSCAOCCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGAAAATGGGCGTAA3
553  CGGTGACGGTGGGAGGCTTATAAAGCAGAGCTCGTTTGTGAAACCGTCAGATCGCCGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCCCAATA
645  GAAGACACCGGGACCGATCCACCCCTCCCGGGCCGGGAACGGTGCATTTGSAACGGGATTCGCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCAT
737  AGAGTCTATAGGCCACCCCGCTTGGCTTTATGATGCTATACTGTTTFFGGTGTGGGGTCTATACACCCCGCTTCCCATGTTATAG3T
829  GATGTTATAGCTTAGCCUATAGGEGIGGGTTATTTGACCATTTATTTGACCACTCCCTATTTGGTACGATACTTTCCATTACTAAECCATAACA
921  TGGCTCTTTGGCCACAACCTCTTATTTGGCTATATGCCAATACACTGTCTCTEAGSAGACTGACACGGACTCTGTATTTTACAGSATGSS3E
1013  CTCATTTATTATTTACAAAATACATATACAACACCCAGCTCCCGCACTTTTATTAACATAACGTTGGATCTCCACGGCAAT
1105  CTGGGTACGTTTCCGSAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCCGCGCGUCAACAGACATAATAGTACACAGA
1197  CTAACAGACTGTTCCTTCCATGGGCTCTTTCTGCACTCAOCTTCTGACACGSGAECGGCCACC  ATG  GAC  ATG  AGG  GGC  CCC
                                                                                   > M  D  H  R  V  F
1281  GCT  CAG  CTC  CTG  GGG  CIG  CTT  CTG  CTC  TGG  CTC  CDT  GGA  GCA  CGA  TGT  GAC  ATT  CAG  CTG  ACC  CAA  TCT
> A  Q  L  L  S  L  L  L  L  W  L  P  S  A  R  C  D  I  Q  L  T  Q  S
1350  CCA  TCC  TCT  TTS  FCC  GGC  TCT  GTG  GGG  GAC  AGG  GTC  ACC  AIC  ACC  TGC  AAG  GCC  AGC  CAA  AGT  GTT  GAT
> P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  T  T  E  X  A  S  Q  S  V  D
1419  TAT  GAT  GGT  GAT  AGE  EAT  ATG  AAC  TGG  TAT  CAA  CAG  AAA  CCA  GGG  AAG  GCT  CCC  AAA  CTC  CTC  ATC  TAC
> Y  D  G  D  S  Y  M  N  W  Y  Q  Q  K  P  G  R  A  P  K  L  L  E  Y
1488  GCT  GCA  TCC  ACT  CTD  GAG  TCT  GGG  GTC  CCA  TCC  AGG  TEE  AGE  GGC  AGT  GGG  TCT  GGG  ACA  GAC  ETC  ACC
> A  A  S  T  L  E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  C  T  D  F  T
1557  CTC  ACA  ATC  AGC  TCA  CTD  CAG  CCA  GAG  GAT  TTC  GCA  ACC  TAT  EAC  TGT  CAA  CAA  GCC  AAC  GAA  GAT  CCT
> L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  A  N  E  D  F
1626  CGG  ACC  TTC  GGT  CAG  GGC  ACC  AAA  GTG  GAA  ATC  AAG  CGG  ACC  GTG  GCT  GCA  CCA  TCT  GTC  TTC  ATC  CTC
> R  T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  F
1695  CCT  CCA  TCT  GAT  GAG  CAG  TIG  AAA  TCT  GGA  ACT  GCC  TCT  GGT  GTG  TGC  CTG  CTG  AAT  AAC  TTC  EAT  CCC
> P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  K  N  F  Y  F
1764  AGA  GAG  GCC  AAA  GTG  CAG  TGG  AAG  GTG  GAT  AAC  GCC  CTC  CAA  TCT  GGC  AAC  TCC  CAG  GAG  AGT  GTC  ACA
> R  E  A  K  V  Q  W  X  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  I
1833  GAG  CAG  GAC  AGC  AAG  GAC  AGC  ACC  TAC  AGC  CTC  AGC  AGC  ACC  CTG  ACC  CTG  AGC  AAA  GCA  GAC  EAC  GAG
> E  Q  D  S  K  L  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E
1902  AAA  CAC  AAA  GTC  TAC  GCC  TGC  GAA  GTC  ACC  CAT  CAG  GGC  CTG  AGC  TCT  CCC  GTC  ACA  AAG  AGC  TTC  AAC
> K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  E  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N
1971  AGG  GGA  GAG  TGT  TGA  GGA  TCCCTGCCCGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTCCCTCTCTGGTCTGGAAGGTGCTACTGCA
> R  G  E  C  • (SEQ ID NO:64)
```

5

Ing. *[Signature]* Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

4082 TTGGAGCTACGGGGTGGGGTGGGGTGGGGATTAGATAAATGGCTGCTCTTTACTGAAAGGCTCTTTACTATTGCTTTATGATAATGTTTCAT
4174 AGTTGGATATCATAATTTAAACAAGCAAAAACAAATTAAGGGCCAGCTCATTCCTTCCACTTATGATCTATAGATCTAIAAGTCCCTGG
4266 GATCATTGTTTTCTCTTTTATTCCTTTTATTCCTTTTGTGGTTCTAAGTACTGTGGTTCCTAAATGGTGGTTCATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC
4358 AGCCTCTGTCCACATACACATTCCTCAGTATTTGTTTTGCCAAGTTCATTCATTCAGAAAGCTGACTCTAGATCTGGATCGAEGAATTC
4450 GGGCCTGATGCCATTTTTCTCTTACGCATCTGTGGGTATTTACACCCGCATATGGTACTCTCAGTACAATCTGGTCTGATGGGGCA
4542 TAGTTAAGCCAGCCCCACACCGCCAACACCCCGTGACCGCCCTGACGGCTTGTCTGGTCCCGGCATCCGCTTACAACAAGCTGGAC
4634 CGTCCCGGGAGCTTATTCAGCAGAGTTTTTACCGTCTACACCGAAGCGCGATACGAAAGGGCTCTGTGATAGCCCTATTTTATAGG
4726 TTAATGTCATGATAAATAAGTTCITAGAGTTCAGGTGGCACTTTTCCGGGAAATGGCGGGAAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATA
4818 CATTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAAATATGAAAAAGGAAAGATATGATATTCACATTCGG
> M S I Q H F R
4910 TGTCCGCTTATTCCTTTTTGGGGATTTGGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAAAGCTGTTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
> V A L I P F F A A F C L P V F A H P E T L V K V K D A E D Q
5002 TGGGTCCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCITGAGAGTTTTGGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC
> L G A R V G Y I E L D L N S G K I L E S F R P E E K F F X X S
5094 ACTTTTAAAGTTTCTGCTATGTGGCGGTATTTATCCGTTATTTGACCGCCGGCAAGACAAATCGGTCGCCGATACACATTTCTCAGAATGA
> T F K V L L C G A V L S R I D A G Q E Q L G R R T E Y S Q N D
5185 CTTGCTTACTACTACCCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATATGCAGTCTGCCATAACCATGAGTATA
> L V E Y S F V T E K H L T D G M T V R E L C S A A I T X S E D
5278 ACACCTCGGGCAACTTACTTCCGACACGATCGGAGGACCGAAGGAGCAACCGCTTTTTCACAAACATGGGGGATCATGTAACTCGCTT
> N T A A K L L L T T I G G P K E L T A F L H N M G D E V T R L
5370 GATCGTTGGAAACCGAGCTGAATGAAGCCATACAAAACGACGAGGTTGACACCAAGAECCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACT
> D R W E P E L N E A I P N D E R D I T M P V A M A T T L R K I
5462 ATTAAGTGGCAACTACTTACTTACCTTCCCGCACAATTAATAGACTGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCTCTCGG
> L T G E L L T L A S R Q Q L I D W M E A D X V A G P L L R S
5554 CCGTCCGGCTGGCTGTTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGTCTGCGGSIATCATTGCAACCACTGGGSCCAGATGSIAG
> A L P A G W F I A D X S G A G E R G S R G I I A A L G P D E K
5646 CCGTCCGATATCGTATGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAAGAAATAGACAGATCGTGGATAGGTGGCTCAGTAT
> P S R I V V I Y T T G S O A T M D E R N R Q I A E I G A S L I
5738 TAAGCATTGGTAACCTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTTGATTTAAACCTCATTTTAAATTTAAAGATCTAGGTGAAGA
> K H W • (SEQ ID NO: 66)
5830 TCGTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCTTCCACTGAGCTTACACCCCTGAGAAAAGATCAAAAGGATCTTCT
5922 TGAGATCCTTTTTTTCTGCGGIAAATCTGCTTCCAAAACAAAAAACACCCCTATCAGCGCTGCTTTGTTTGGCGGATCAAGASCTIACC
6014 AACTCTTTTTCCGAAAGTAACTGGCTTACGACAGAGCGGAGATACCAATACCTTCTCTAATGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 05BM-041R

```
6106 ACTCTGTAGTACCGCTACATAACCTCGCTCTGCTAATCTCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCATAAGTCGTGTCTTACCGGGTGGAC
6198 TCAAAGACGALAGTTACCGGATAAGGCGAGCGTCCGGCTGAAAGGGGGGTTCCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
6290 ACTGAGATACCTACAGCCTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTCCCGAAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAA
6282 CAGSAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTCTGTCGGGTTCCGCACCTCTGACTTGAGCGTGGATTT
6474 TTCTGATGCTCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCITTTTACGGTCTCTGGCCTTTTCTGGCITTTTGTCA
6566 CATCTCTTCTTCCGCTTATCCCTGATTCCTGTGATAACCGEATTTACCCTCTTGTGAGTGGAGTGTATAACCGCTCGCCGACGCGAAAGCAAG
6558 AGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAAGCGAAAGAGCGCCCAATACGCCAAACCGCTCTCCCGCGCGTTCGCGGATTCATTAAATGACGCTGG
6750 CACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACCTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTT
6642 TATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAGGAAACAGCCTATGACCATGATTACGCCAAGC (SEQ ID NO: 67 )
```

La sequenza nucleotidica completa del plasmide pJP010 (Figura 5) è mostrata di seguito. Le tre cornici di lettura aperte sono la catena pesante 24F4, la diidrofolato reductasi murina e la beta-lattamasi.

```
1  TTCACATTGATGATTTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACCGGGTCAATAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAACTTA
93  CGGTAAATGGCGCGCTGGTGAACGCCCAAGACCCCGCCCATTTGACGCTCAATAATGACGATGTTCCCATAGTAAAGCCAAATAGGGACT
185  TTCATTGACCTCAATGGCTGGAGTATTTACCGTAAACTGCCCACTTGGTACTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
277  CSTCAATGACCGTAAATGGCGCGCTGGTGAATATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTTATAGTCA
369  TCGTATTATCATGGGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGTCTGGATAGCGGTTTGGCTCACGGGATTTCCAAAGTCCGACCCCAT
461  GACCTCAATGAGGATTTTTCGACCAAAAATCAAGGGGACTTTCGAAATGTCGTAAAGACTCGCGCCCATTTACGCAAAATGGGCGTAC
553  GCGTGTACGGTGGGAGGCTATATGAGCAGAGCTGTTTTAATGAAACCTCAGATCGCCTGGAGCGCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATA
645  GAAGACACCGGGAAGCATCCAGCCTCCGCGCCCGGAAACGGTGCATTTGSAACCGCGATTCCCTCTGGCAAGAGTACGTAAGTACCGCCTAT
737  AGAGTCAATAGGCCACCCCTTTGGCTCTCTATGCAATGCTATCTGTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCCTCATGTTATAGGT
829  GATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTTGACCAATTTGACCACTCCCTATTGGTGGAGATACTTCCACTACCAATCCATAACA
921  TGGCTCTTTTGGCAAACTCTCTTTTATTTGGCTATATGCAATACACHTGCCCTTCAGAGACTGACACGSACTCTGTAATTTTACAGGATGGGGI
1013  CTCATTTATTTTACAAATTCACATAIACAACACCACCGTCCCGAGTGGTCTTAAATTAACATAACGTTGGGATCTCCACCGCAAT
1105  CTCGGGTACGCTTCCGGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCGCGCGCCACGACATAAATAGCTGACAGA
1197  CTAACAGACTGTTCCCTCCATGGTCTTTTTCGCGAGTACCGTCTTGGACACGGGATCCGCCACC ATG GGT TGG AGC CTC ATC
                                     M G W S L I
1281  BTG CTC TTC CEE GTC GCT GTT GDE ACC CGG GTC CTG TCC GAC GTC CAG CTG GTG GAG TCE GGG GGA GGC
    > L L E L V A V A T R V L S D V Q L V E S G G G
1370  CTG CTG AAG CDT GSA GGG TCC BTG AGA CTC TCC TCC GCA GCC TCF GSA TTC ACT TTC AGT ACC PAT ACC
    > L V K P G G S I R L S C A A S G P T E S T Y T
5  1419  ATG TCT TGG GTI CGG CAA GCA CCI GGC AAG GGA CTE GAG TCG GTC GCA ACC ATT AGT CCA GGA GAC AGT
```

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

> M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S P G D S
1488 TTC GGC TAC TAC TAT CCA GAC AGT GTC CAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AGT
> F G Y Y Y F D S V Q G E F T I S R D N A K K S
1557 CTG TAC CTG CAA ATG AAC ACT CTG AGG GCA GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC CGA GAT ATE TAC
> L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D I Y
1626 TAT AAT TAC GGA GCC TGG TTT GGT TAC TGG GGC CTA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT AGC GCT TCC ACC
> Y N Y S A W F A Y W G Q G T L V T V S S A S T
1695 AAG GGC CCA TCC GTC TCC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCT GCC CTG GGC
> K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
1754 TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC
> C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
1833 GTG CAC ACC TTC CCC GCT GTC CTG CAA TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC TCC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
> V E T F F A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
1902 TCC AGC AGC TTS GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
> S S S L G T Q T Y I C K V N H K P S N T K V D
1971 AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAG ACT CAC ACA TGC CCA CCT TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
> K K V E P K S C D K T E T C P P C P A P E L L
2040 GGG GGA CCT TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG
> G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
2109 GTC ACA TGC GTG GTG GTG CAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAT GTT GAC GGC
> V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
2178 GTG GAG GTC CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCT CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACC TAC CCG GTG GTC AGC
> V E V H N A X T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
2247 GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAA GAC TGG CTG AAT GGC AAG CAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC
> V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A

2316 CTC CGA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
> L P A P T E K T T S K A K G Q P R E P Q V Y T
2385 CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAA GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
> L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
2454 CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCT GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACA CCT CCC
> P S D T A V E W E S N G Q P E N N Y X T T P F
2523 GTG TTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC TCC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG
> V L D S D G S F F L Y S K L T V D X S R W Q Q
2592 GGG AAC GTC TTC TCA TCC TCC CTG ATG CAT GAG GCT CTC CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTC TCC
> G N Y F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
2661 CTG TCT CCC GGT TGA GGA TCCC GCCC GGGTGGC ATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCCTGGTGTGGAAGGTGCTACGCCA
> L S P G • (SEQ ID NO: 68)

2748 GTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTCTTTCACTAGGTGTCCCTGTATAAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGT
2840 ATGGAGCAAGGGGCAAGTGGGAAGACAACTTGTAGGGGCTTCAGSECTATTGGGAACCAAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCATCTTGGCTGG
2932 CTGCAATCTCCCTCTCTGGGTTCAAGGCATCTCCCTGCTCAGTCTCCCGAATAGTTGGGATCCAGGCATGCACGACCAGGCTCAGCTAA
3024 TTTTGTATTCTTCTTGTAGAGGCGGTTTCAACCATATTGGCCAGTCTGCTCTCCATCTCTCCGAACTTCAGGTAATCCGGCCGCTCGGCTCC
3116 CAATTTGCTGGGATACAGTATGAGCCACTGGGCTCTCCCTGCTCCTGATTTTAAATTAATTATACAGCAGAAAGGCTCCAGACACA
3208 GATGGGCTACCTGGCCATGCCAGCCAGTGGACATTTGAGTGGTGGCTGGCACTSTCTCTCATGAATTCGTGCACAGATCTGGCAG
3300 CACCATGGCTGAAATAACCTCTGAAAGAAGAACTTGGTTAGGTAACCTCTGAGGCGGAAGAACCAGCTGTGGAAATGGTGTCACTAGG
3392 TGTGAAATCTCCAGGCTCCCGCAGCAGGACAGATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTTGGAAAGTCCCGAGGCTC
3484 CCGCAGGCGAGAAAGTATSCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACCCCGCCATCCCGCCCTAACCCCG
3576 CCAATTCGCGCATCTCCCGCCATGGCTGACATTAATTTTTTATTTATGCAAGAGGCGAGGCGGCTCGGCTCTGAGTATTCCAGAA
3668 TAGTGAGGAGGCTTTTGTGGAGGCTAGGTTTTGCAAAAAGCTGGTCTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGAGAAAGTGGT
3760 GTGAGGCAATGGCAGGTAAGTATCAAGGTAACAAGCAGGTTTAAAGGAGCAATAGAAAAGCTGGGCTTGTGAGACAGAGAAAGACTCTTGG
3852 GTTCTGATAGGACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGCCACTCCAGTTCAATAGAGCTTTAAGGC
3944 TAGAGTACTTAACTACACTACTATAGGCTAGCATGGTTCGACCACTGAACTGCATCGTCGCGTGTCCCAAAATATGGGATGGCAAGAA

D M V R P I N C T V A V S Q N K G I G K N
4036 CCGAGACCTACCCGGCTCCGCTCAGGAACGAGTCAAGTACTCCAAAGAATGACCAACCTCTTCAGTGGAAAGGTAACAGAACTCTGG
> G D L P W P P L R N E F K Y F Q R M T T I S S V E G K Q N L
4128 TGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTCTCCATCCCTGAGAAGAATCCGACCTTTAAAGGACAATTAATATAGTCTCAGTAGAGAACTCAAA
> V I M G F K T W F S I P E K N F F L K D R I N I V L S K E L K
4220 GAACCACTCAACAGCTCATTCTCTTCCAAAAGTTTGGATGATGGCTTAAGACTTATTCAACAACCGAATTTGGCAAGTAAAGTAGAGAT
> E T P R G A H F L A K S L D D A L R E I E Q P E L A S K V D M
4312 GGTGGATAGTGGGAGGAGTCTCTTTAAGGAGGAGCCATGAATCAACCAGGCGCCCTCAGATCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAA
> V W T V G G S S V Y Q E A M N Q P G H L R L F V T R I M Q E

4404 TTTAAAGTGCACGTTTTCCCGAAATGATTTGGGAAATAAAGCTTCTCCAGAAATAAGGAGGCTCCCTCTCAGAGGCCAGGAGGAA
> F E S D T F F P E T D L G K Y K I L P E Y P G V L S E V Q E E
4496 AAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAGACTAACCCGAGAAATTCACGCTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGSGGGCCGG
> K G I K Y K F E V Y E K K D * (SEQ ID NO:69)

4588 CCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAACTAGAAATGACGTGAAAAAATGCTTTATTTGIGAAATTEG
4680 TGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAAACAACTTAACAACAACAATTTGATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGG
4772 AGGTGTGGGAGGPTTTTAAAGCAAGTAAACCTTACAAATGTGGTAAAAATCGATAAGGATCTGTGGAAGAAATTCACIGGCCGCGTITTA
4864 CAACGTCGTGACTGCGAAAAACCGTGGGTTACCCAACTTAATGCGCTTSCAACAATCCGCTTTTCGCCAGCTGGGTAATAGCGAAGAGG
4956 CCGCRCCGATCCGCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGGATGCGGTTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGATTT
5048 CACACCCGATATGGTGCACCTCTAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCGGCAACACCGGCTGACCGGGG
5140 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCCGTAGCTGCATGTGTCAGAGCTTTTACCGTCACTACC
5232 GAAACCGCGGAGACGAAAGGCGCTCGTGATACCGCTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAAATAATGTTTCTTAGAGCTCAGGTCGACTT
5324 TTCGGGAAATGTGCGGTAACCCCTATTTGTTATTTTCTAATAACATCCAAATAGCATCCGCTCATGAGACATAACCCGATAAATG
5416 CTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGCTGTCGCGCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCGCTTTT
 > M S I Q E F E V A L I P P F A A F C L P V F
5508 TGCTACCCGAAACGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGCTGACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGIA
 > A E P E T L V K V K D A E D O L G A R V G Y I E L D L K S G
5600 AGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACIIIIIAAGTTCGCTATGTGGGCGGTTATTATCCGCTATGAC
 > X T L E S F R F E E R F P M M S T F K V L L C G A V L S R I D
5692 GCGGGCAAGAGCAACTCCGTCGCGGATACACTATTTCGAAATGACTTGGTTGAGTACTCAGCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGATGG
 > A G Q E Q L G R R I H Y S Q N D L V E Y S P V T E K H L T D G
5784 CATGACAGTAAAGAAATTAAGCAAGTGCCTAACATGAGTATAACACTGCGGCAACTTACTTCTGACAAAGATCGGAGACCGAAGS
 > H T V R E L C S A A I T M S D N T A A N L L L T T I G G P K
5876 AGCTAACCCGCTTTTTCGACAAACATGGGGGATCATGTAATCGGCTTGTCTTGGGAACCGGAACTGAATGAGCCATACCAACGACGAG
 > E L T A F L H N K G D H V T R L D R W E P E L N E A I P N D E
5968 CGTGACACCAGATGCCGTAGCAATGGCAACAACGTTGGGCAACTATTAAGTGGGAACTTACTTCTAGCTTCCCGCAACAATTAAT
 > R D T T M P V A M A T T L R K L L T G E L L T L A S R Q Q L I
6060 AGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTCAGGACCACTTCTGGGCTCGGCCCTCCGGCTGGGTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCGGTTG
 > D W M E A D K V A G P D L R S A L P A G W F I A D K S G A G
6152 AGCGTGGGTCFCGCGSEATCATTCGACACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCTAGTTATCTACAGCAGGGGAGTCAAGCAACT
 > E R G S R Q I I A A L G P D G K P S R I V V I Y T T G S Q A T
6244 ATGGATGACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTGCTCCTACTGATTAAGCATTGGSEAACTGTCAGAACCAAGTTTACTCATATATCTTTA
 > M D E R K R Q I A E I G A S L I K H W * (SEQ ID NO:70)
6336 GATGATTTAAACATCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTTTGATAACTCTCATGAOCAAATCCCTAAACGCGAGTTTT
6426 CGTTCCTAGTGGTTCAGAACCCGTAGAAAAGATCAAAAGGATCTTCTTGAATCTTTTCTTCTGCGGCTAATCTGCTGCTGCAACAA
6520 AAACCAACCGCTACCGCGCTGTTTCTTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGCTAACTGCTTACGACAGCGCAGATACC
6612 AAATACTGTTCTTCTAGTGAAGCGTGGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTGCGCTGCTAATCTGCTTAC

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.R. n° USBM-041R

```
6704 CAGTGGCTGTGCCAGTGGCGAFAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTADGGATAAGGGGCAGCGGTCGGGDTGAAAG  
6795 GGGGGTTGGTGCACACACACCCACGCTTGGAGCGAAGGACCTACACCGAAGCTGASATACTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAGCGGCACGCTTCC  
6888 CGAAGGGAGAAAGGGCGACAGGTATCCGGTAAGCGCAGGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATC  
6980 TTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCGTGGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGGAGGUCATGSAAAAACCCGAGC  
7072 AACGGGGCCTTTTTACGGTCCCGGGCCTTTTGGCTGGCCCTTTTGCCTCACATGTCCTTCCCGGTTATCCDCTGATTCTGTGGATAACCGTAT  
7164 TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCGAAGGAAAGGAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAAGGGAAGAGCGCCCAATAC  
7256 GCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGCTTGGCCGATTCATTAATGGAGCTGGCAGGACAGGTTTCCCGAETGGAAAGCGGCGAGTGGGCAACGCA  
7348 ATTAATGTGAGTFAAGCAGCTCACTAGGCAACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGTCGSHATGTTGTGTGGAATTGEGAGCGGATAACA  
7440 ATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATACGCCAAGC (SEQ ID NO: 71)
```

Esempio 9. Costruzione della linea cellulare

La cellula ospite utilizzata era una linea di cellule ospite carente diidrofolato reduttasi (*dhfr*) di ovaio di criceto cinese, CHO-DG44. La banca di
5 cellule ospiti DG44 è stata testata e trovata negativa per la presenza di agenti avventizi prima dell'uso. L'ospite DG44 (CER-00-05-01) è stato utilizzato per la costruzione di linee cellulari che esprimono l'anti-BDCA2.

I plasmidi pJP009 e pJP010 che esprimono la catena leggera ricodificata e la catena pesante di anti-BDCA2, rispettivamente, sono stati trasfettati nella
10 linea di cellule ospiti mediante elettroporazione. Le cellule trasfettate che esprimono *dhfr* sono state selezionate usando un mezzo carente di nucleosidi α . Dopo la selezione nel mezzo privo di nucleosidi α MEM sopra descritto, il pool trasfettato è stato arricchito per linee cellulari ad alta espressione usando una
15 combinazione di selezione cellulare attivata per fluorescenza e lo strumento Genetix Clonepix FL (CER-00-09-03). Le colonie cellulari isolate da ClonePix FL sono state prelevate dal terreno semisolido in piastre a 96 pozzetti. I singoli pozzi sono stati ampliati e la produttività è stata valutata. La linea cellulare che mostrava il titolo più elevato nell'analisi fed-batch della beuta di agitazione (n. 49) è stata trasferita a Research Animal Fermentation per la crescita in un
20 bioreattore da 10 litri per la generazione di materiale per la caratterizzazione.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 458BM-041R

Dopo lo screening iniziale della linea cellulare, le linee cellulari a più alta produzione sono state selezionate per l'amplificazione. Le linee cellulari superiori sono state sottoposte all'amplificazione del metotrexato (MTX). Pool amplificati sono stati subclonati usando la diluizione limitante a una densità teorica di 0,5 cellule per pozzetto in piastre da 384 pozzetti. I singoli pozzetti di piastre da 384 pozzetti sono stati ripresi utilizzando uno strumento Cellavista (Innovatis) per la presenza di una singola cella per pozzetto e verificati come clonali.

Le prime quattro linee cellulari amplificate e clonali sono state selezionate in base alla beuta in scala ridotta e all'analisi della qualità del prodotto. Le banche cellulari pre-master (Pre-MCB) sono state realizzate da queste prime 4 linee cellulari che sono valutate in bioreattori. È stato selezionato un sottoclone principale in base alle prestazioni del bioreattore e all'analisi della qualità del prodotto. Una fiala pre-MCB della linea di celle di piombo è stata trasferita alla produzione per la generazione di unabanca cellulare Master.

Esempio 10. Modifiche post-traduzionali dell'anticorpo anti-BDCA2, BIIB059

a) Ossidazione

La mappatura del peptide Endo-Lys C dell'anticorpo BIIB059 anti-BDCA2 ha rivelato che la catena pesante Met-257, Met-433 e Trp-163 sono siti sensibili all'ossidazione. I livelli variavano dal 4 al 7%. Dati sperimentali indicano che gran parte dell'ossidazione è correlata alla preparazione del campione.

b) Deamidazione

L'analisi della mappa peptidica Endo-Lys-C dell'anticorpo BIIB059 ha

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mostrato che ~2,5% ciascuno di Asn-389, Asn-394 e Asn-395 nella catena pesante era deamidato (formazione combinata di deamidazione e succinimide), e che circa il 2,5% di Asn-320 nella catena pesante è stato deamidato (in una forma succinimidica). La quantità totale di forme di succinimide per Asp-32 e
5 Asp-34 nella catena leggera era ~3%. L'isomerizzazione combinata di Asp-32 e Asp-34 nella catena leggera era ~5%. Simile all'ossidazione, alcune di queste modifiche possono essere correlate alla preparazione del campione.

c) Glicazione

La glicazione è una modifica non enzimatica causata dalla reazione di
10 gruppi amminici su proteine con glucosio, un componente del terreno di coltura. La glicazione viene regolarmente rilevata nelle proteine e i livelli variano ampiamente a seconda delle condizioni delle colture cellulari. Nell'anticorpo B1B059, il livello di glicazione, misurato mediante analisi di massa intatta della proteina non ridotta, era ~10%. L'analisi della mappatura dei peptidi ha rivelato
15 ~0,46% della glicazione su Lys-107 della catena leggera, 0,28% su Lys-103 della catena leggera e ~0,2% su Lys-295 della catena pesante O-legata

d) Glicosilazione

Non è stata rilevata glicosilazione O-legata di B1B059.

e) Altre modifiche (ad esempio idrossialina, eccetera)

20 Le analisi hanno mostrato che <1% della catena pesante dell'anticorpo B1B059 è in forma aglicosilica. L'analisi non ha mostrato sostituzioni da Asn a Ser e non vi sono state modifiche o mutazioni sconosciute a un livello $\geq 1\%$ nell'anticorpo.

25 **Esempio 11. Legame diretto di B1B059 alla superficie cellulare delle cellule dendritiche plasmacitoidi**


M. Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

È stato sviluppato un saggio del sangue intero citometrico a flusso per valutare il legame B1B059 al BDCA2 sulle cellule dendritiche plasmacitoideide umane o di cinomolgo (pDC). Il sangue periferico di macaco cinomolgo (Toxikon, Inc, Bedford, MA) o umano (Biogen Idec) sono stati raccolti in
5 provette per la raccolta di eparina di sodio e mantenuti a temperatura ambiente. Un cocktail anticorpale colorante FACS per identificare i pDC è stato aggiunto a ciascuna aliquota di sangue intero, incorporando anticorpi CD20, CD14, CD123 e HLA-DR. Il cocktail di isotipo hIgG marcato con Alexa647 B1B059 (Biogen Idec, Lotto n. 17073-057) o con marchio Alexa647 è stato aggiunto al cocktail di
10 colorazione FACS, a una concentrazione compresa tra 0 e 40 µg/mL. Il sangue è stato incubato su ghiaccio, protetto dalla luce, per 30 minuti. Dopo 30 minuti, ogni 500 µl di aliquota di sangue intero (cyno) o 100 µL (umano) è stata trattata con 10 mL (cyno) o 2 mL (umano) di 1X Easy Lyse Buffer (Leinco Technologies) che era stato incubato a 37 °C per almeno un'ora. Dopo 10-15
15 minuti, l'incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 1400 guru/min per 5 minuti. Il surnatante è stato travasato, lasciando solo un pellet di globuli bianchi (WBC). Ogni pellet WBC è stato lavato con 5 mL di tampone FACS (1% BSA + 0,002% NaAzide + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂ in PBS) e centrifugato a 1400 giri/min per 5 minuti. Il surnatante è stato travasato
20 e ciascun pellet di WBC è stato risospeso in 200 µl di tampone FACS e trasferito su una piastra con fondo rotondo a 96 pozzetti (Fisher Scientific). La piastra è stata centrifugata a 1400 giri/min per 5 minuti. Il surnatante è stato scaricato dalla piastra e ciascun pellet WBC è stato lavato con 200 µL di tampone FACS. La piastra è stata centrifugata a 1400 giri/min per 5 minuti e il
25 surnatante è stato scaricato dalla piastra. Dopo il lavaggio (come sopra), i

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 05BM-041R

globuli bianchi sono stati risospesi in 200 µl di paraformaldeide all'1% (PFA) in PBS e fissati a 4 °C durante la notte, protetti dalla luce. Immediatamente prima dell'analisi della citofluorimetria, i globuli bianchi sono stati filtrati utilizzando una piastra filtrante in maglia di nylon da 60 micron (Millipore). Ogni pellet è stato
5 quindi trasferito in una nuova piastra inferiore rotonda da 96 pozzetti e centrifugato a 1400 rpm per 5 minuti. Ciascun pellet WBC è stato risospeso in 250 µL di tampone FACS e intensità di fluorescenza misurata su una macchina FACS a 4 colori LSRII. La compensazione del colore singolo è stata acquisita utilizzando il set di sfere di particelle di compensazione Ig anti-topo (BD
10 Biosciences). L'analisi è stata eseguita utilizzando i software FlowJo e GraphPad Prism. Il BII059 ha associato il cinomolgo e le cellule umane in modo simile con valori EC₅₀ di 1-2 µg/mL (7-13nM) (Figura 6).

Esempio 12. Valutazione dell'associazione autonoma per BII059

Il test AlphaScreen è un test di prossimità omogeneo che utilizza sfere di
15 donatore e accettore di glutatione (Perkin Elmer) per legare GST FcRIIa (CD32a) umano. In questa miscela sono state aggiunte varie concentrazioni di anticorpi da testare. Poiché il legame dell'anticorpo con FcRIIa è monovalente, l'unico modo per generare un segnale è se le microsfele donatore e accettore hanno entrambe un anticorpo legato che quindi si associa portando le
20 microsfele entro 200 nm consentendo la produzione di ossigeno singoletto e conseguente emissione di luce. Il livello di emissione rilevato dallo strumento Envision (Perkin Elmer) è proporzionale al grado di autoassociazione.

La Figura 7 mostra i risultati della schermata Alpha per BII059 rispetto a 5c8 (controllo negativo) e LT105 (controllo positivo con forte autoassociazione).

Esempio 13. Valutazione del legame non specifico di BII059

La cromatografia a interazione incrociata (CIC) è un metodo ad alto rendimento per la valutazione preliminare della viscosità dei candidati mAb [Jacobs et al., Pharm Res., 27 (1): 65-71 (2010)]. In questo metodo, le IgG umane policlonali sfuse sono accoppiate chimicamente a una resina cromatografica attivata dal NHS. I tempi di ritenzione di BIIB059 su colonne non derivatizzate e IgG-derivate sono stati quindi confrontati con un pannello di controllo di mAb con un buon comportamento e con scarso comportamento. BIIB059 non ha mostrato prove di legame non specifico con questo metodo, come dimostrato dai suoi bassi tempi di ritenzione e dai valori di K'.

10 **Dati CIC che mostrano solubilità e legame non specifico**

Anticorpo	Solubilità	Rt-Test	Rt-Bianco	K'	
5C8	buona	9,3	9,46	-0,017	
Hu H0/L0	cattiva	14,1	10,4	0,356	← valori di K' più alti possono indicare
Li33	cattiva	10,8	9,2	0,174	← minore solubilità
Erceptina	buona	9,5	9,4	0,011	
15F3 H4/L1 (1-3)	buona	9,3	9,2	0,011	
24F4 H4/L1 (1-5)	buona	9,3	9,1	0,022	
16A8	buona	9,1	9	0,011	

Esempio 14. Valutare la stabilità di BIIB059

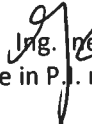
La fluorometria a scansione differenziale è stata utilizzata per testare la stabilità di BIIB059 in una gamma di condizioni tampone per la formulazione di ricerca iniziale. Lo sviluppo delle proteine è stato monitorato su un sistema PCR in tempo reale Mx3005p (Agilent Technologies) in un formato a 96 pozzetti utilizzando 10 µg di proteine in 50 µL di PBS (a pH 7,0) integrato con fluoroforo di arancio SYPRO a una concentrazione finale di 10X (basato su

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Denominazione stock di Invitrogen di 1000X). I campioni sono stati riscaldati da 25 °C a 95 °C a 1 °C/min con intensità di fluorescenza misurata tre volte ogni 1 °C. Le intensità di fluorescenza sono state tracciate in funzione della temperatura. Tm sono stati derivati da queste curve prendendo la derivata
5 negativa (" $-R'(T)$ " nel software Mx3005p) e selezionando i minimi locali dei grafici derivati. Usando un tampone di base di 20 mM di citrato di sodio, il pH è stato variato da 5,0 a 7,5 e NaCl e le concentrazioni di saccarosio sono state variate da 50 a 250 mM. La stabilità era simile in tutti questi intervalli di tampone. La Figura 8 mostra i dati con 150 mM di NaCl e 250 mM di saccarosio
10 in funzione del pH. 20 mM di citrato di sodio, 150 mM di NaCl a pH 6,0 sono stati scelti come formulazione di ricerca sul saccarosio a causa della difficoltà a raggiungere elevate concentrazioni con saccarosio utilizzando concentratori centrifughi di ricerca.

Esempio 15. Valutazione della stabilità dell'agitazione di BIIB059

15 Un volume di 0,2 mL della soluzione BIIB059 mAb a 1 mg/mL in 20 mM di citrato di sodio, pH 6,0, 150 mM di NaCl è stato sottoposto ad agitazione reciproca a temperatura ambiente in flaconcini di vetro da 2 mL (Waters, WAT270946C) usando un Lab-Line Instruments modello 4626 Agitatore per piastra di titolazione impostato a 600 giri/min. L'aggregazione è stata valutata
20 monitorando gli aumenti della torbidità a 320 nm usando uno spettrofotometro Beckman DU640. BIIB059 ha visualizzato l'aggregazione dipendente dal tempo. Gli anticorpi IgG1 umani di tipo selvatico normalmente non si aggregano in queste condizioni di agitazione. Come mostrato nella Figura 9, l'aggregazione è stata completamente soppressa dall'aggiunta dello 0,03% di
25 Tween 80, un eccipiente di formulazione comune. L'aggregazione indotta

Ing.  Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° OSBM-041R


dall'agitazione può talvolta essere altamente dipendente dal pH. L'aglicosil IgG4/IgG1 ha mostrato un'aggregazione più rapida e più ampia rispetto a BIIB059. Anche l'aggregazione di IgG4/IgG1 di aglicosile è stata soppressa con l'aggiunta di Tween 80.

5 **Esempio 16. Valutazione della stabilità di BIIB059**

La stabilità e la viscosità dei campioni BIIB059 sono state misurate a concentrazioni elevate di 150 mg/mL e superiori, per supportare il potenziale sviluppo del prodotto per la somministrazione sottocutanea. Le soluzioni di BIIB059 sono state centrifugate in tubi ultra-concentratori per limitare i volumi e
10 le concentrazioni raggiunte sono state determinate mediante scansioni UV. La stabilità è stata determinata mediante cromatografia di esclusione dimensionale dopo la conservazione a 2-8 °C per una e due settimane. Concentrazioni di proteine superiori a 200 mg/mL sono state prontamente raggiunte per piccole
15 quantità di proteine in 20 mM di citrato, pH 6, 150 mM di tampone NaCl e aggregato sono rimasti bassi (0,68%) dopo due settimane a 2-8 °C. È stata misurata la viscosità utilizzando uno strumento Viscopropo2000 (Cambridge Viscosity). La viscosità a 150 mg/mL era solo 8 cP nel tampone citrato/soluzione salina. Questi risultati dimostrano che dovrebbe essere possibile ottenere una formulazione ad alta concentrazione di BIIB059.

20 **Esempio 17. Clonazione del gene umano BDCA2**

Il cDNA umano BDCA2 (huBDCA2) a lunghezza intera è stato subclonato nel vettore di clonazione pCR4TOPO di Invitrogen da Open Biosystems: questo plasmide è stato designato pEAG2367. Il sequenziamento del DNA ha confermato che il suo cDNA era identico al cDNA BDCA2 umano a
25 lunghezza intera nel numero di accesso Genbank di riferimento NM_130441. La


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

cornice di lettura aperta a tutta lunghezza huBDCA2 codificato da pEAG2420 è mostrato di seguito, con il dominio transmembrana previsto da TM-HMM sottolineato:

```
1  MVPEEEPQDR EKGLWVWFLK VWSMAVVSIL LLSVCFTVSS VVPHNFMYSK
51  TVKRLSKLRE YQYHPSLTC VMEGKDIEDW SCCPTPWTSE QSSCYFISTG
101 MQSWTKSQKN CSVMGADLVV INTREEQDFI IQNLKRNSY FLGLSDPGGR
151 RHWQWVDQTP YNENVTFWHS GEPNNLDERC AIINFRSSEE WGWNDIHCHV
201 PQKSICKMKK IYI* (SEQ ID NO:1)
```

5 La cornice di lettura aperta a tutta lunghezza huFcεR1γ codificata da pEAG2413, che è identico alla sequenza di riferimento nel numero di accesso Genbank NP_004097, è mostrata di seguito:

```
1  MIPAVVLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
51  RKAITSYEK SDGVYTGSLT RNQETYETLK HEKPPQ* (SEQ ID NO:2)
```

Un vettore di espressione CHO che co-esprime sia i cDNA umani BDCA2 sia FcεR1γ in unità trascrizionali in tandem è stato costruito subclonando il frammento *Spe* I da 2,11 kb da pEAG2413 nella catena principale vettoriale *Spe* I da 6,71 kb linearizzato di pEAG2420, ottenendo un "univector" designato pEAG2456. I cDNA umani BDCA2 e FcεR1γ in pEAG2420 sono stati confermati in sequenza. Una linea cellulare CHO stabile che co-esprime stabilmente i cDNA BDCA2 e FcεR1γ è stata prodotta per trasfezione con pEAG2456.

Esempio 18. Clonazione del gene BDCA2 di Cyno e Rhesus

La cornice di lettura aperta di BDCA2 di macaco dedotta codificata da pEAG2384 e una delle forme SNP osservate in pEAG2383 vengono mostrati di seguito. Questo modulo SNP viene indicato di seguito come modulo SNP E73 del BDCA2 di cyno. Nel rhesus, è stata osservata una singola sequenza identica alla forma SNP E73 del BDCA2 di cyno.

Ing. Irles Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

```
1  MVPEEEPQDR EKGVWVWFQLK VWSVAVVSIL LLCVCFTVSS VASHNFMYSK
51  TVKRLSKLQE YQYYPSLTC VMEGGKDMEDW SCCPTPWTSE QSSCYFISTV
101 MQSWTKSQNN CSVMGADLVV INTKEEQDFI TQNLKINSAY FLGLSDPKGW
151 RHWQWVDQTP YNKNVTFWHS GEPNSPDERC AIINFRSEEW GWNDVHCHVP
201 QKSICKMKKI YI* (SEQ ID NO:72)
```

In una seconda forma SNP del BDCA2 di cyno, il residuo 73 (GAA = Glu, E) evidenziato sopra è la lisina (AAA = Lys, K). Questa seconda forma SNP è indicata come la forma SNP K73 di BDCA2 di macaco cinomolgo. Nel BDCA2 umano, il residuo 73 è acido glutammico. Di seguito è mostrato l'allineamento vuoto delle sequenze BDCA2 umane (superiore) e macaco (inferiore), che condividono un'identità del 90,6%. I potenziali siti di glicosilazione N-collegati sono ombreggiati. Il BDCA2 di macaco manca di un potenziale sito di glicosilazione legato all'N presente nell'uomo (NSS a 137-139 nell'uomo contro NSA nel macaco).

```
1  MVPEEEFPQDREKGLWVWFQLKVWSMAVVSILLLSVCFTVSSVPHNFMYSK 50
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1  MVPEEEFPQDREKGVWVWFQLKVWSVAVVSILLLCVCFTVSSVASHNFMYSK 50

51  TVKRLSKLREYQYHPSLTCVMEGKDIEDWSSCPTPWTSEFQSSCYFISTG 100
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51  TVKRLSKLQEQYQYYPSLTCVMEGKDMEDWSSCPTPWTSEFQSSCYFISTV 100

101 MQSWTKSQNNEGVMGADLVVINTREEQDFIIQNLKNSSYFLGLSDPGR 150
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 MQSWTKSQNNEGVMGADLVVINTKEEQDFITQNLKINSAYFLGLSDPKGW 150

151 RHWQWVDQTPYNENSFWHSGEPNLDERCAIINFRSSEEWGWNDIHCHV 200
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
151 RHWQWVDQTPYKNNSFWHSGEPNSPDERCAIINFR. SEEWGWNDIVHCHV 199

201 POKSICKMKKIYI* 214 (SEQ ID NO:1)
   | | | | | | | | | |
200 POKSICKMKKIYI* 213 (SEQ ID NO:72)
```

Di seguito è mostrato una cornice di lettura aperta di FcεR1γ di consenso di macaco cinomolgo:

```
1  MIPAVLLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
51  RKAASIASYEK SDGVYTGSTRNQETYETLK HEKPPQ (SEQ ID NO:73)
```

La sequenza di cDNA di FcεR1γ di macaco cinomolgo è una corrispondenza perfetta con quella del cDNA di rhesus previsto (basato su

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° U8BM-041R

letture brevi genomiche) descritte nel numero di accesso XM_001115585 di Genbank e una sequenza di cyno depositata come numero di accesso Genbank AF485816 dagli scienziati di Genentech. La sequenza della proteina cyno FcεR1γ condivide l'identità del 98,9% con la proteina FcεR1γ umana, differendo per una sola sostituzione conservativa. L'allineamento tra FcεR1γ umano (superiore) e cyno (inferiore) è mostrato di seguito:

```
1 MIPAVVLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV 50
  |||
1 MIPAVVLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV 50

51 RKAATSYEKSDGVYTG LSTRNQETYETLKHEKPPQ* 87 (SEQ ID NO:2)
  |||
51 RKAATASYEKSDGVYTG LSTRNQETYETLKHEKPPQ* 87 (SEQ ID NO:73)
```

Un vettore di espressione CHO co-esprimente sia la forma cyno E73 SNP di BDCA2 e FcεR1γ cDNA in unità trascrizionali tandem è stato costruito subclonando del frammento Spel da 2,11 kb da pCN652 nella catena principale vettoriale di Spel I da 6,72 kb fosfatata e linearizzata di pCN654, dando come risultato un "univettore" designato pEAG2668. I cDNA di BDCA2 di cyno e FcεR1γ in pEAG2668 sono stati confermati in sequenza. Una linea cellulare CHO stabile che co-esprime stabilmente i cDNA BDCA2 e FcεR1γ è stata prodotta per trasfezione con pEAG2668.

Esempio 19. Reattività incrociata tra BDCA2 umano e cyno

Per determinare se E73/K73 BDCA2 SNP di macaco cinomolgo ha interessato il legame anti-BDCA2, 293E cellule sono state co-trasfettate con vettori di espressione che trasportavano un reporter EGFP (pEAG1458) e BDCA2 e FcεR1γ cDNA (BDCA2 umano: pEAG2420 e FcεR1γ: pEAG2413; E73 BDCA2 di cyno: pCN652 o K73 BDCA2: pCN656 e FcεR1γ di cyno: pCN652) con rapporti molarari 1:1:1. 3 giorni post-trasfezione, le cellule sono state raccolte

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 05BM-041R

e colorate con Miltenyi coniugato con mAb anti-umano AC144 di BDCA2 PE-
coniugato (numero di catalogo Miltenyi Biotec 130-090-511) in una titolazione
FACS di diluizione a legame diretto, gating su cellule verdi EGFP positive. La
Figura 10 mostra il legame diretto di AC 144 con BDCA2 umano e cyno
5 superficiale.

Gli apparenti EC50 sono essenzialmente equivalenti per le BDCA2
umane e per entrambe le forme SNP E73 e K73 di BDCA2 di macaco
cinomolgo. Dato questo risultato, sono stati generati trasfettanti CHO stabili per
BDCA2 di superficie a tutta lunghezza usando il vettore di espressione umana
10 BDCA2/FcεRIγ pEAG2456 e il vettore di espressione cyno E73 SNP
BDCA2/FcεRIγ pEAG2668. Queste linee sono state utilizzate per il triage di
anticorpi anti-BDCA2 cross-reattivi umani/cyno.

**Esempio 20. Costrutti di fusione Fc di ectodomini di BDCA2 umani e di
cinomolgo.**

15 Sono stati progettati cinque costrutti di fusione Fc di ECD BDCA2 umano
e cyno. In tre dei costrutti, BDCA2 è collegato tramite una sequenza di linker
G4S al terminale C della cerniera IgG1 umana e Fc. In due dei costrutti, il linker
G4S è stato sostituito con un sito di scissione proteasi TEV ENLYFQC.

Poiché BDCA2 è una proteina di membrana di tipo II (il terminale C è
20 esterno alla cellula), la progettazione di proteine di fusione Fc solubili ha
comportato l'aggiunta dell'ectodominio C-terminale di BDCA2 (residui 45-213
per BDCA2 umano) al terminale C di Fc IgG ingegnerizzati con secrezione è
stato guidato da una sequenza di segnali a catena leggera kappa murina
incorporata. Il costrutto huBDCA2 a lunghezza intera pEAG2367 è stato
25 utilizzato come modello per PCR con primer 5 'CAG TGT CTG TTT CAC TCC

CGG GGG TGG CGG TGG TAG CAA TTT TAT GTA TAG C 3' (SEQ ID NO: 74) (per aggiungere un 5' Xmal (Pro-Gly) e Gly4Ser linker immediatamente prima della fine 5' dell'ectodominio di huBDCA2) e 5' CCA GGG AGA ATA GGA TCC TTA TAT GTA GAT CTT 3' (SEQ ID NO: 75) (per aggiungere
5 immediatamente un sito BamHI 3' dopo il terminatore huBDCA2). Il prodotto PCR da 0,56 kb è stato purificato e clonato nel vettore di clonazione pCRBluntIIPO di Invitrogen, producendo pEAG2417, la cui sequenza di cDNA dell'inserito è stata confermata. Il frammento Xmal-BamHI da 0,53 kb di pEAG2417 e il frammento NotI-Xmal da 0,75 kb di pEAG1397 (che trasportava
10 un hulgG1 Fc ingegnerizzato la cui secrezione è guidata da una sequenza di segnali a catena leggera kappa murina ingegnerizzata nel telaio) sono stati legati con la sequenza BamHI-di 1,89 kb XbaI e 4,17 kb XbaI-NotI frammenti di spina dorsale vettoriale dal vettore di espressione pV90, producendo il vettore di espressione della proteina di fusione hulgG1 Fc-huBDCA2 pEAG2421, la cui
15 sequenza di inserti di cDNA è stata confermata. La cornice di lettura aperta dedotta codificata da pEAG2421 è mostrata di seguito:

```
1  MKLPVRLVL MFWIPASSE PKSSDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
51  PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP
201 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
251 GGGGSNFMYS KTVKRLSKLR EYQQYHPSLT CVMEGKDIED WSCCPTPWTs
301 FQSSCYFIST GMQSWTKSQK NCSVMGADLV VINTREEQDF IIQNLKRNSs
351 YFLGLSDPGG RRHWQWVDQT PYNENVTFWH SGEPNLDER CAIINFRSSE
401 EWGWNDIHCH VPQKSICKMK KIYI* (SEQ ID NO:76)
```

sequenza del segnale della catena leggera kappa: residui 1-19 sopra (corsivo)
20 IgG1 umano Fc: residui 20-250 sopra
Linker G4S: residui 251-255 sopra (in grassetto)
ectodominio huBDCA2: residui 256-424 sopra (sottolineato)

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Per costruire un vettore di espressione per una proteina di fusione mulgG2a Fc-huBDCA2, il frammento XmaI-BamHI da 0,53 kb da pEAG2417 e il frammento NotI-XmaI da 0,75 kb da pEAG1442 (che trasporta un IgG2a Fc murino ingegnerizzato la cui secrezione è guidata da una sequenza di segnalazione ingegnerizzata in-frame della catena leggera kappa murina) sono stati legati con i frammenti di catena principale vettoriale 1,89 kb BamHI-XbaI e 4,17 kb XbaI-NotI dal vettore di espressione pV90, producendo pEAG2423, la cui sequenza di inserti di cDNA è stata confermata. La cornice di lettura aperta dedotta codificata da pEAG2423 è mostrata di seguito:

1 MKLPVRLVL MFWIPASSE PRGPTIKPSP PCKCPAPNLL GGPSVFIFPP
51 KIKDVLMSL SPIVTCVVVD VSEDDPDVQI SWFVNNVEVH TAQTQTHRED
101 YNSTLRVSA LPIQHQDWMS GKEFKCKVNN KDLPAPIERT ISKPKGSVRA
151 PQVYVLPPE EEMTKKQVTL TCMVTDMPPE DIYVEWTNNG KTELNYKNTE
201 PVLDSGGSYF MYSKLRVEKK NWVERNNSYSC SVVHEGLHNN HTTKSFSRTP
251 GGGGSNFMY SKTVKRLSKL REYQQYHPSL TCVMEGKDIE DWSCCPTPWT
301 SFQSSCYFIS TGMQSWTKSQ KNCSVMGADL VVINTREEQD FIIQNLKRNS
351 SYFLGLSDPG GRRHWQWVDQ TPYNENVTFW HSGEPNNLDE RCALINFRSS
10 401 EEWGWNDIHC HVPQKSICKM KKIYI* (SEQ ID NO: 77)

sequenza del segnale della catena leggera kappa: residui 1-19 sopra (corsivo)

IgG2a murina Fc: residui 20-251 sopra

Linker G4S: residui 252-256 sopra (in grassetto)

ectodominio huBDCA2: residui 257-425 sopra (sottolineato)

15 Linee cellulari CHO stabili che producono le proteine di fusione Fc-huBDCA2 sono state prodotte per trasfezione con vettori di espressione pEAG2421 e pEAG2423. Queste proteine di fusione sono state utilizzate nei test di legame ELISA e Octet per il triage di anticorpi durante lo screening del candidato.

20 Per progettare il BDCA2 di cinomolgo (cyno) per produrre una proteina proteica di fusione Fc, la variante E73 SNP a lunghezza intera del BDCA2 di cyno nel costrutto pCN648 è stata sottoposta a mutagenesi sito-diretta con

Ing. Ives Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

primer 5 'CTC TGT GTC TGT TTC ACT CCC GGG GGT GGC GGT GGT AGC
AAT TTT ATG TAT AGC 3 '(SEQ ID NO: 78) e il suo complemento inverso, per
aggiungere un linker 5' XmaI (Pro-Gly) e Gly4Ser immediatamente prima
dell'estremità 5 'dell'ectodominio huBDCA2, producendo il costrutto pEAG2675,
5 la cui sequenza di inserimento cDNA è stata confermata. Per costruire un
vettore di espressione per una proteina di fusione mulgG2a Fc-cyno BDCA2, il
frammento XmaI-BamHI da 0,53 kb da pEAG2675 e il frammento NotI-XmaI da
0,75 kb da pEAG1442 (che trasporta un Fc di IgG2a murino ingegnerizzato la
cui secrezione è guidata da una sequenza di segnalazione ingegnerizzata in-
10 frame della catena leggera kappa murina) sono stati legati con i frammenti di
catena principale vettoriale 1,89 kb BamHI-XbaI e 4,17 kb XbaI-NotI dal vettore
di espressione pV90, producendo pEAG2677, la cui sequenza di inserti di
cDNA è stata confermata. La cornice di lettura aperta dedotta codificata da
pEAG2677 è mostrata di seguito:

1 MKLPVRLVL MFWIPASSSE PRGPTIKPSP PCKCPAPNLL GGPSVFIFPP
51 KIKDVLMLSL SPIVTCVVVD VSEDDPDVQI SWFVNNVEVH TAQTQTHRED
101 YNSTLRVVA LPIQHQDWMS GKEFKCKVNN KDLPAPIERT ISKPKGSVRA
151 PQVYVLPPE EEMTKKQVTL TCMVTFMPE DIYVEWTNNG KTELNYKNTE
201 PVLSDGGSYF MYSKLRVEKK NWVERNSYSC SVVHEGLHNN HTTKSFSRTP
251 GGGGSNFMY SKTVKRLSKL QEYQYYPSL TCVMEGKDME DWSCCPTPWT
301 SFQSSCYFIS TVMQSWTKSQ NNCSVMGADL VVINTKEEQD FITQNLKINS
351 AYFLGLSDPK GWRHWQWVDQ TPYNKNVTFW HSGEPNSPDE RCAIINFRSE
15 401 EWGWNVDVHCH VPQKSICKMK KIYI* (SEQ ID NO: 79)

sequenza del segnale della catena leggera kappa: residui 1-19 sopra (corsivo)

IgG2a murina Fc: residui 20-251 sopra

Linker G4S: residui 252-256 sopra (in grassetto)

ectodominio BDCA2 cyno: residui 257-424 sopra (sottolineato)

20 Una linea cellulare CHO stabile che produce la proteina di fusione
BDCA2 Fc-cyno è stata prodotta per trasfezione con il vettore di espressione
pEAG2677.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Le proteine di fusione mulgG2a Fc-BDCA2 sono state sottoposte a proteolisi limitata, per isolare le proteine monomeriche di ectodominio BDCA2. Per facilitare l'isolamento dell'ectodominio BDCA2 solubile ricombinante, sono stati costruiti nuovi costrutti di fusione Fc in cui è stato inserito un sito di

5 scissione della proteasi TEV tra il terminale C dell'Fc e il terminale N dell'ectodominio BDCA2. Sinergie che trasportano ectodomini BDCA2 umani o cyno ingegnerizzati con un sito Xma I 5' (Pro-Gly) per la fusione con il terminale C Fc seguito da un sito di scissione TEV in cornice (ENLYFQG) fusa per

10 residuo 45 della sequenza BDCA2 e un sito in 3' di BamHI dopo il terminatore BDCA2 sono stati progettate e consegnate dallo GeneWiz come inserto di Xma I-Bam HI del loro vettore di clonazione pUC57-amp proprietario. Le sequenze degli inserti in costrutti ingegnerizzati di cDNA di ectodomni Xma I-BamHI TEV-BDCA2 cDNA, pEAG2917 (umano) e pEAG2918 (cyno), sono state confermate. Per costruire vettori di espressione di CHO pV90-IRES-DHFR-

15 basati per proteine di fusione Fc-hulgG1 TEV-BDCA2, il frammento da 0,75 kb Not I-Xma I di pEAG1397 e i frammenti da 0,54 kb Xma I-Bam HI sia di pEAG2917 sia di pEAG2918 sono stati subclonati in un frammento di catena principale da 5.4 kb Bgl II-NotI di pXJC194, producendo pEAG2937 (Fc-huBDCA2) o pEAG2938 (BDCA2 Fc-cyno). I cDNA dell'inserto in pEAG2937 e

20 pEAG2938 sono stati confermati in sequenza. Linee cellulari CHO stabili sono state generate dalla trasfezione con pEAG2937 e pEAG2938. La cornice di lettura aperta dedotta codificata della proteina di fusione huFc-TEV-huBDCA2 codificata da pEAG2937 viene mostrata di seguito:

```
1  MKLPVRLLVL  MFWIPASSSE  PKSSDKTHTC  PPCPAPELLG  GPSVFLFPPK
51  PKDTLMISRT  PEVTCVVVDV  SHEDPEVKFN  WYVDGVEVHN  AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL  TVLHQDWLNG  KEYKCKVSNK  ALPAPIEKTI  SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD  ELTKNQVSLT  CLVKGFYPSD  IAVEWESNGQ  PENNYKTTPP
201 VLDSGDGFFL  YSKLTVDKSR  WQQGNVFSCS  VMHEALHNHY  TQKSLSLSPG
251 ENLYFQGNFM  YSKTVKRLSK  LREYQQYHPS  LTCVMEGKDI  EDWSCCPTPW
301 TSFQSSCYFI  STVMQSWTKS  QNNCSVMGAD  LVVINTREEQ  DFITQNLKRN
351 SSYFLGLSDP  GRRRHQWVD  QTPYNENVTF  WHSGEPNNLD  ERCAIINFRS
401 SEEWGWNDIH  CHVPOKSICK  MKKIYI* (SEQ ID NO:80)
```

sequenza del segnale della catena leggera kappa: residui 1-19 sopra (corsivo)

IgG1 umano Fc: residui 20-250 sopra

Sito di scissione TEV: residui 251-257 sopra (in grassetto)

5 ectodominio huBDCA2: residui 258-426 sopra

La cornice di lettura aperta dedotta della proteina di fusione BDCA2 huFc-TEV-cyno codificata da pEAG2938 è mostrate di seguito:

```
1  MKLPVRLLVL  MFWIPASSSE  PKSSDKTHTC  PPCPAPELLG  GPSVFLFPPK
51  PKDTLMISRT  PEVTCVVVDV  SHEDPEVKFN  WYVDGVEVHN  AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL  TVLHQDWLNG  KEYKCKVSNK  ALPAPIEKTI  SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD  ELTKNQVSLT  CLVKGFYPSD  IAVEWESNGQ  PENNYKTTPP
201 VLDSGDGFFL  YSKLTVDKSR  WQQGNVFSCS  VMHEALHNHY  TQKSLSLSPG
251 ENLYFQGNFM  YSKTVKRLSK  LQEYQQYYPS  LTCVMEGKDM  EDWSCCPTPW
301 TSFQSSCYFI  STVMQSWTKS  QNNCSVMGAD  LVVINTKEEQ  DFITQNLKIN
351 SAYFLGLSDP  KGWRHWQWVD  QTPYNKNVTF  WHSGEPNSPD  ERCAIINFRS
401 EEWGWNDVHC  HVPQKSICKM  KKIYI* (SEQ ID NO:81)
```

sequenza del segnale della catena leggera kappa: residui 1-19 sopra (corsivo)

10 IgG1 umano Fc: residui 20-250 sopra

Sito di scissione TEV: residui 251-257 sopra (in grassetto)

ectodominio BDCA2 cyno: residui 258-425 sopra (sottolineato)

Esempio 21. BIIB059 che si lega alle proteine di fusione BDCA2-Fc

La capacità di BIIB059 di legare huBDCA2-Fc in soluzione è stata valutata da SEC (Figura 11). Se analizzato da solo, BIIB059 (pannello superiore) e huBDCA2 (pannello centrale) eluiscono come singoli picchi acuti con masse molecolari di ~150 kDa. Quando BIIB059 e huBDCA2-Fc sono stati miscelati e analizzati (pannello inferiore), si è verificato uno spostamento di BIIB059 e huBDCA2-Fc a masse superiori di > 550 kDa, come risulta dalla loro

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

eluizione in posizioni precedenti nel cromatogramma. L'eterogeneità nel picco di eluizione è presumibilmente causata dal fatto che entrambi BIIIB059 e BDCA2-Fc contengono ciascuno 2 siti di legame e di conseguenza si forma un gran numero di complessi con stechiometrie diverse di BIIIB059 e BDCA2.

5 Anche il legame di BDCA2 ECD cyno a BIIIB059 è stato valutato da SEC e allo stesso modo ha portato a uno spostamento quantitativo verso complessi di massa molecolare più elevata.

Esempio 22. Il calcio potenzia il legame di BIIIB059 a BDCA2

10 Il legame di BIIIB059 con BDCA2 umano fuso con Fc murino (huBDCA2-muFc) in presenza di calcio o EDTA è stato studiato in un saggio di legame Octet. La proteina huBDCA2-muFc è stata catturata su un biosensore Fc anti-murino, seguito dall'associazione di BIIIB059 e dalla fase di dissociazione. Tutte le fasi sono state eseguite in HEPES 50 mM, pH 7, NaCl 100 mM, 1 mg/mL di BSA, 0,02% di Tween 20 e 0,001% di azoturo contenente 10 mM di CaCl₂ o 10
15 mM di EDTA.

La Figura 12 mostra che il legame con BIIIB059 è potenziato dall'aggiunta di calcio rispetto all'EDTA che porta a un segnale circa 2 volte più alto. Sia il tasso di associazione sia quello di dissociazione erano influenzati dal calcio.

Esempio 23. Misurazioni di legame

20 Octet è stato usato per monitorare il legame di BIIIB059 con la proteina di fusione BDCA2-Fc e l'ECD BDCA2. La Figura 13 mostra un esperimento di Octet in cui BIIIB059 è stato caricato su puntali di Octet Fc anti-umani a una concentrazione di 20 µg/mL. Per la fase dell'associazione, è stato aggiunto
25 BDCA2 ECD umano e di cinomolgo a una concentrazione di 2 µg/mL. Il

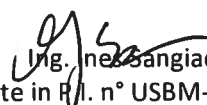

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

tampone per questo esperimento era HEPES 50 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, 1 mg/mL di BSA, 0,02% di Tween 20 e 0,001% di azoturo. In queste condizioni, l'associazione di BIIB059 all'ECD BDCA2 umano e cyno era comparabile

5 **Esempio 24. Dosaggio PBMC per determinare il valore IC₅₀ per BIIB059 per l'inibizione della produzione IFN α indotta da TLR9**

È stato dimostrato che il legame BDCA2 attiva una cascata di segnalazione simile al BCR, che sopprime potentemente la capacità dei pDC di produrre IFN di tipo I e altre citochine in risposta ai ligandi TLR [Cao W. et al.,
10 PLoS Biol., 5(10):e248 (2007)]. L'inibizione della produzione di IFN α indotta da TLR9 da parte di PBMC è stata utilizzata come dosaggio cellulare primario per lo screening.

I PBMC dal sangue venoso eparinizzato di donatori sani sono stati isolati mediante centrifugazione graduale discontinua su Ficoll, lavati in PBS e
15 risospesi in terreno di coltura completo (RPMI con FBS al 3%). 1×10^6 cellule sono state seminate/pozzate e stimolate con 10 μ g/mL del ligando TLR9 (CpG-A ODN 2216) in presenza di dosi di BIIB059 e 24F4A-Agly (una versione paralizzata Fc di BIIB059), o mAb controllo isotipo da 10 μ g/mL a 1 pg/mL in un volume di dosaggio totale di 200 μ L/pozzetto. Le piastre sono state incubate
20 durante la notte (18 ore) a 37 °C e i supernatanti sono stati raccolti per la valutazione nei saggi ELISA IFN α (PBL InterferonSource). I saggi sono stati eseguiti secondo il protocollo del produttore. Le titolazioni di BIIB059 e 24F4A sono state testate per determinare l'IC₅₀ per l'inibizione della produzione di IFN α indotta da TLR9. Un totale di dodici esperimenti indipendenti ha dato un IC₅₀
25 medio di 0,001 μ g/mL per BIIB059. Il mAb aglicosilato era meno potente, con


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in R.I. n° USBM-041R

un IC₅₀ medio di 0,007 µg/mL (Figura 14).

È stata anche testata la capacità di mAb anti-BDCA2 di inibire la produzione di IFN α a seguito di stimolazione con un ligando fisiologicamente rilevante, vale a dire, sieri di pazienti con LES. Si ritiene che i sieri di LES inducano il tipo IIFN attraverso complessi di autoanticorpi anti-DNA e DNA ipometilato immunostimolante che stimolano il TLR9. Le PBMC sono state stimulate con sieri di un paziente affetto da LES (fornito dal Dr. Gregg Silverman, NYU) e utilizzati a una diluizione finale di 1/5. L'anticorpo 24F4S H4/L1C95S, che differisce da BIIB059 per 1 residuo di amminoacido, ha completamente abrogato la produzione di IFN α dai pDCs stimolati di LES (Figura 18).

Esempio 25. Produzione di IFN α indotta da TLR9 nel saggio del sangue intero

L'attività di BIIB059 è stata anche valutata in un saggio del sangue intero sulla produzione di IFN α indotta da TLR9.

Il sangue intero è stato prelevato dal sangue venoso eparinizzato di donatori sani. Le dosi di BIIB059 e 24F4A-Agly variavano da 10 µg/mL a 1 pg/mL in un volume di dosaggio totale di 200 µl/pozzetto. CpG-A è stato aggiunto a 200 µg/mL, che è risultato essere ottimale per la stimolazione della produzione di IFN α nel sangue intero. Le piastre sono state incubate per 18 ore a 37 °C e i surnatanti sono stati raccolti per l'uso nei test ELISA IFN α (PBL InterferonSource). I saggi sono stati eseguiti secondo il protocollo del produttore. Nella Figura 15A è mostrato un esperimento rappresentativo di 6 esperimenti indipendenti eseguiti. La potenza inibitoria di BIIB059 nel test IFN α indotto da TLR9 nel sangue intero era simile alla potenza osservata nei test


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I., n° USBM-041R

PBMC. Oltre a inibire le citochine derivate dal pDC (IFN α , IL-6), il trattamento con BIIB059 ha portato anche all'inibizione di una vasta gamma di citochine e chemochine (Figura 15C).

Il seguente esperimento è stato condotto per determinare se BIIB059 potrebbe inibire la produzione di IFN α indotta da TLR9 nel sangue intero da pazienti affetti da LES in modo simile a volontari sani. A tal fine, ELISA ha stimolato il sangue intero da 2 pazienti con LES o 2 controlli sani con 200 $\mu\text{g/mL}$ di CpGA in presenza di 10 $\mu\text{g/mL}$ di BIIB059 e la produzione di IFN α . In particolare, il sangue intero proveniente da 2 pazienti affetti da LES o da 2 donatori sani è stato fornito da Bioreclamation LLC mediante spedizione durante la notte. All'arrivo, il sangue è stato trattato con 10 $\mu\text{g/mL}$ di BIIB059 o controllo isotipico e stimolato con 200 $\mu\text{g/mL}$ di CpG-A e placcato in una piastra da 96 pozzetti. Le piastre sono state incubate per 18 ore a 37 °C e i surnatanti sono stati raccolti per l'uso nei test ELISA IFN α (PBL InterferonSource). I saggi sono stati eseguiti secondo il protocollo del produttore.

Come mostrato nella Figura 15B, BIIB059 ha mostrato una potenza simile nel sangue intero dei pazienti affetti da LES rispetto ai volontari sani.

Esempio 26. Valutazione dell'inibizione mediata da BIIB059 degli interferoni di tipo I.

L'attività inibitoria di BIIB059 è stata confermata anche utilizzando pDC purificati stimolati con agonisti TLR sintetici (CpG-A) o lo stimolo più fisiologico (sieri LES). È stato anche determinato l'effetto inibitorio della reticolazione BDCA2 su altre citochine derivate da pDC (IL-6). L'attività di BIIB059 è stata confermata utilizzando una varietà di approcci come la reazione a catena della polimerasi qualitativa ed ELISA.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

a) Q-PCR

Tredici sottotipi di IFN α e un singolo membro di IFN β esistono negli esseri umani. La stimolazione con agonista TLR9 comporta la sovraregolazione della maggior parte degli IFN di tipo I [Ito T. et al., Blood, 107 (6): 2423-31
5 (2006)]. L'inibizione di singoli geni di tipo IIFN è stata valutata utilizzando saggi qualitativi di reazione a catena della polimerasi (Q-PCR).

I pDC sono stati purificati usando una procedura di separazione magnetica in due fasi (kit MACS, Miltenyi Biotec). 5×10^4 pDC/pozzetto sono state stimolate con 5 μ M CPG-A in presenza o assenza di concentrazioni
10 crescenti di BIIB059 o 10 μ g/mL di controllo isotipico. Il volume totale del dosaggio era di 200 μ l/pozzetto. Le piastre sono state incubate per 18 ore a 37 °C e l'RNA è stato estratto dalle cellule utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen corporation) e ulteriormente purificato utilizzando una mini colonna RNeasy (Qiagen Sciences). Tutti i primer e le sonde sono state acquistate da Applied
15 Biosystems Inc. Le quantità relative di trascrizione sono state determinate per ciascun campione confrontandole con la curva standard dell'oligonucleotide utilizzando il software di rilevamento della sequenza (Applied Biosystems Inc.) e normalizzate con un controllo (GAPDH).

Il trattamento con BIIB059 ha inibito la trascrizione di tutti gli IFN di tipo I
20 testati, ricapitolando quindi i dati precedenti utilizzando il clone di anticorpi anti-BDCA2 AC144 [Cao W. et al., PLoS Biol., 5 (10): e248 (2007)].

b) ELISA

L'effetto di BIIB059 sull'inibizione delle citochine pDC è stato testato a livello di proteine usando ELISA. 5×10^4 pDC/pozzetto purificate sono state
25 stimolate con 5 μ M CPG-A in presenza o assenza di concentrazioni crescenti di

BIIB059 o 10 µg/mL di controllo isotipico. Nella Figura 17 sono mostrate le quantità di IFNα e IL-6 secrete misurate da un donatore rappresentativo di tre donatori sani testati.

Il legame di BDCA2 con BIIB059 ha potenzialmente inibito la produzione di IFNα e ridotto notevolmente la produzione di IL-6 indotta dalla stimolazione CpG-A.

Esempio 27. Interiorizzazione dei recettori mediata da BIIB059

È stato dimostrato che il legame di BDCA2 con mAb anti-BDCA2 (clone AC144, Miltenyi) induce rapidamente l'interiorizzazione dei recettori [Dzionek A. et al., J. Immunol., 165 (11): 6037-46 (2000)]. Il seguente esperimento era diretto a determinare la cinetica dell'interiorizzazione BDCA2 mediata da BIIB059.

Il sangue intero umano è stato trattato con 10, 1, 0,1 o 0,01 µg/mL di BIIB059 o un controllo isotipico (10 µg/mL) a 37 °C per i periodi indicati e quindi incubato per 30 'a 4 °C con FITC anti-BDCA2 mAb (clone 2D6) senza etichetta con blocco incrociato, anti-HLADR, anti-CD123, anti-CD14 e anti-CD20. I globuli rossi (globuli rossi) sono stati lisati usando 1X tampone Easy-lyse (BD Bioscience) e le restanti cellule sono state riparate. Nella Figura 19A sono mostrati i valori di intensità di fluorescenza media (MFI) della colorazione 2D6-FITC di CD14-CD20-HLA-DR + CD123 + pDC controllate. La FMO (fluorescenza meno un controllo) consisteva nel cocktail di colorazione FACS meno 2D6-FITC. I dati in questa figura sono un esperimento rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti eseguiti.

Come mostrato nella Figura 19A, dopo incubazione con BIIB059 a 1 µg/mL, l'intensità della colorazione 2D6 marcata con FITC è diminuita

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

rapidamente raggiungendo i livelli di fondo entro un'ora dall'incubazione a 37 °C. Una concentrazione dieci volte più bassa di BIIB059 (0,1 µg/mL) ha influenzato la cinetica dell'endocitosi ritardandola di 2 ore. Questo dimostra che BDCA2 è interiorizzato dopo la legatura con BIIB059 con cinetica dose-
5 dipendente.

Il seguente esperimento è stato condotto per accertare se l'internalizzazione del recettore mediata da BIIB059 ha influenzato l'inibizione dell'IFN. Il sangue intero è stato raccolto dal sangue venoso eparinizzato di donatori sani e pre-incubato con BIIB059 (per consentire l'internalizzazione dei
10 recettori) o isotopo per la durata indicata. Ad ogni momento successivo alla pre-incubazione, le cellule sono state sottoposte a sfida con 200 µg/mL di CpGA e incubate per altre 18 ore a 37 °C. I surnatanti sono stati raccolti per l'uso nei test ELISA IFNα (PBL InterferonSource). I saggi sono stati eseguiti secondo il protocollo del produttore. La Figura 19B è un esperimento rappresentativo di 3
15 esperimenti indipendenti eseguiti. Come mostrato nella Figura 19B, dopo 9 ore di preincubazione con BIIB059 prima della stimolazione, corrispondente alla massima internalizzazione, non ha influenzato l'inibizione dell'IFN, suggerendo che l'endocitosi BDCA2 e l'inibizione TLR9 sono potenzialmente collegate. Per verificare questa ipotesi sono stati utilizzati mAb anti-BDCA2 che non erano in
20 grado di mediare l'inibizione dell'IFN e hanno dimostrato la mancanza di internalizzazione. Inoltre, abbiamo precedentemente dimostrato che il legame bivalente era necessario per l'inibizione dell'IFN mediata da anti-BDCA2. In realtà, il frammento di Fab non ha portato all'internalizzazione o all'inibizione dell'IFN. Nel loro insieme, questi dati aumentano la possibilità che l'inibizione
25 TLR9 mediata da BDCA2 richieda endocitosi e localizzazione in compartimenti

Ing. Francesco Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 4585BM-041R

endosomiali contenenti TLR9. Questa ipotesi può essere testata usando l'imaging dal vivo per tracciare l'internalizzazione e il traffico di BDCA2 nella cellula dopo la ligazione di BIIB059.

Esempio 28. Funzione di effettore anticorpale

5 Il dominio Fc di BIIB059 è una IgG1 umana completamente glicosilata, ed è competente a legare entrambi i recettori e complementi Fc γ cellulari e a indurre le risposte delle cellule immunitarie dell'effettore cellulare, sia attraverso la citotossicità dipendente dall'antigene (ADCC) sia la citotossicità dipendente dal complemento (CDC). Al fine di confermare il legame di BIIB059 con i
10 recettori Fc, le affinità di legame relative sono state misurate utilizzando la tecnologia del dosaggio omogeneo di prossimità luminescente amplificato (ALPHA) di Perkin Elmer (Figura 20). Il saggio è stato eseguito in un formato competitivo in cui le diluizioni seriali degli anticorpi in esame sono state incubate con le proteine di fusione recettore-GST e le sfere dell'accettore anti-
15 GST durante la notte a 4 °C in una piastra da 96 pozzetti. Anche le microsfeere di donatore di streptavidina e le IgG1 biotinilate di tipo selvaggio sono state incubate durante la notte a 4 °C in una provetta separata e quindi aggiunte alla piastra del saggio il giorno successivo. Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 2 ore con agitazione delicata e lette in un lettore di
20 piastre Envision (Perkin Elmer). I dati sono stati tracciati su una curva a 4 parametri utilizzando il software Graphpad Prism per calcolare i valori IC50 al fine di determinare le relative affinità di legame. Valori IC50 di BIIB059 per Fc γ R1: 0,03 μ g/mL, Fc γ R11a: 11 μ g/mL Fc γ R11b: Sono stati calcolati 17 μ g/mL Fc γ R11a: e 3 μ g/mL. Questi valori sono in linea con quelli osservati per altri
25 anticorpi IgG1 umani in questo test. Sono stati anche determinati i valori di IC50

Ing. Lino Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBA4-041R

per la versione con funzione effettrice agly G4P/G1 di 24F4 utilizzata nel cyno. Come previsto, non è stato rilevato alcun legame con FcyR11a, FcyR11b e FcyR111a e il legame con FcyR1 è stato ridotto di 100 volte. L'anticorpo 5c8 sia in IgG1 WT che in G4P/G1 agly framework sono stati inclusi nei saggi come
5 comparatori.

Esempio 29. Fissazione del complemento

È stato dimostrato che il rivestimento anticorpale di bersagli media i potenti meccanismi di uccisione tramite ADCC o CDC. Queste funzioni effettrici degli anticorpi sono mediate dalla regione Fc dell'anticorpo. Questo
10 esperimento è stato diretto a testare la capacità di B1B059 di reclutare complemento testando la sua associazione a C1q da ELISA.

Il saggio di legame C1q è stato condotto in un formato ELISA a 96 pozzetti usando piastre ELISA Maxisorb. L'anticorpo di prova è stato rivestito in una serie di diluizioni 3 volte in PBS a partire da 15 µg/mL durante la notte a 2-
15 8 °C e i pozzetti sono stati quindi lavati con PBS, 0,05% di Tween 20 e bloccati con 200 µl di 0,1 M di fosfato di Na pH 7,2, 0,1 M di NaCl, 0,1% di gelatina, 0,05% di Tween 20. Successivamente, sono stati addizionati 50 µl/pozzetto di 2 µg/mL di C1q umano della tecnologia del complemento (A099) diluiti in tampone blocco/diluente e incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo
20 aver aspirato e lavato come sopra, sono stati aggiunti 50 µl/pozzetto di C1q anti-IgY umano di pollo (produzione personalizzata di Aves Labs, Inc usando Sigma C1q, C0660 umano) diluito 8.000 volte in un blocco/tampone di diluente. Dopo incubazione per 1,5 ore a temperatura ambiente i pozzetti sono stati aspirati e lavati come sopra. Il coniugato IgY HRP anti-pollo Donkey F(ab')₂
25 (Jackson ImmunoResearch 703-030-155) diluito a 5.000 volte in blocco/diluente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

è stato quindi aggiunto a 50 µl/pozzetto e incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo aver aspirato e lavato come sopra, sono stati aggiunti 100 µl di substrato TMB (420 µM di TMB, 0,004% di H₂O₂ in tampone acetato di sodio 0,1 M/acido citrico, pH 4,9) e incubati per 2 minuti prima di interrompere con
5 100 µl di 2 N di acido solforico. L'assorbanza è stata letta a 450 nm con uno strumento Softmax PRO e il software Softmax è stato utilizzato per determinare l'affinità di legame relativa (valore C) con un adattamento di 4 parametri.

La Figura 21 mostra che mentre BIIB059 è in grado di legare C1q, 24F4A IgG4.P/IgG1 agly è essenzialmente privo di legame C1q.

10 **Esempio 30. Studi sull'esaurimento cellulare**

BIIB059 inibisce potentemente la produzione di IFN di tipo I e IL-6 dopo la ligazione di BDCA2. Oltre alla sua attività agonistica, questi esperimenti sono stati condotti per valutare se BIIB059 potrebbe esaurire i pDC portatori di BDCA2 in virtù del suo Fc funzionale. Per studiare la potenza citotossica di
15 BIIB059 è stata testata la sua attività nei test ADCC e CDC.

a) Saggio ADCC

ADCC è un meccanismo in base al quale una cellula effettrice del sistema immunitario lisa attivamente una cellula bersaglio, i cui recettori di superficie sono stati legati da anticorpi (Figura 22).


20 La linea cellulare CHO (EAG2456 T1F2 Clone 34.16.7) è stata utilizzata come cellula bersaglio. Il livello di espressione di BDCA2 sulla superficie delle cellule CHO è stato determinato mediante FACS utilizzando un mAb anti-BDCA2 marcato APC (clone AC144, Miltenyi). Le cellule NK sono state utilizzate come cellule effettrici e sono state separate dal sangue intero per
25 selezione negativa utilizzando il cocktail di arricchimento delle cellule NK

umane RosetteSep™ (Stem Cells Technologies). Dopo un'incubazione di 20 minuti con il cocktail a temperatura ambiente, le cellule NK sono state isolate mediante centrifugazione discontinua in gradiente su ficoll. Le cellule CHO e le cellule NK umane sono state seminate con un rapporto di 5:1 (NK: CHO) in presenza di mAb anti-BDCA2 competenti per effettori (24F4S e B1IB059), mAb paralizzanti Fc (24F4S-Agly e 24F4A-Agly) o IgG1 controllo isotipico e incubato per 4 ore a 37 °C. Il controllo negativo consisteva in pozzetti contenenti cellule CHO e NK senza anticorpi. Le cellule NK e CHO lisate con Tx-100 sono state utilizzate per determinare la massima uccisione. L'ADCC è stato valutato utilizzando il kit del saggio di citotossicità Vybrant (Invitrogen), seguendo le istruzioni del produttore. Il saggio rileva G6PD da cellule danneggiate in base alla riduzione di resazurina G6PD-dipendente che emette fluorescenza a 590 nm dopo eccitazione a 530 nm. Il saggio ADCC illustrato nella Figura 22 nel pannello A è stato eseguito utilizzando celle CHO ad alta espressione di BDCA2 (pannello C) mentre il test ADCC nella Figura 22 nel pannello B ha utilizzato celle CHO con espressione BDCA2 inferiore (pannello D).

24F4S ha portato all'uccisione al 100% di cellule CHO portanti BDCA2 simili alla lisi del tritone X. Come previsto, la versione aglicosilata del mAb (24F4S-agly) non ha portato all'ADCC (Figura 22A). Rispetto a 24F4S, B1IB059 aveva un'attività ADCC identica (Figura 22 B). Da notare l'efficienza dell'uccisione correlata con il livello di espressione di BDCA2 sulle cellule CHO (Figura 22C e Figura 22D).

b) Saggio CDC

Nella citotossicità dipendente dal complemento (CDC), C1q lega l'anticorpo innescando la cascata del complemento e portando alla lisi cellulare


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(Figura 23). Come mostrato nella sezione Esempio 29, B1B059 può legare in modo efficiente il componente C1q del complemento. Questo esperimento è stato eseguito per confermare che B1B059 può mediare CDC.

Le cellule transfettanti stabili CHO-BDCA2/FcεRIγ (EAG2456 T1F2
5 Clone 34.16.7) sono state seminate a 5×10^4 cellule in piastre da pozzo nero da 96 pozzetti di collagene e incubate a 37 °C per 48 ore. Le piastre sono state quindi lavate e incubate con complemento di siero di coniglio e ioduro di propidio (PI) in presenza di mAb anti-BDCA2 competenti di effettore (24F4S e B1B059), mAb carenti di funzione di effettore (24F4S-Agly e 24F4A-Agly) o
10 controllo isotipico IgG1 per 1h a 37 °C. Il controllo negativo consisteva in pozzetti contenenti cellule CHO, complemento sierico di coniglio e PI, senza anticorpi. Le cellule NK e CHO lisate con T-100x sono state utilizzate per determinare la massima uccisione. Le piastre sono state lette utilizzando il lettore di piastre a fluorescenza a citofluor (ex530/em645). I mAb anti-BDCA2
15 (B1B059 e 24F4S) hanno portato all'uccisione cellulare da parte di CDC simile alla lisi del Triton. Come previsto, i mAb aglicosilati con carenza dell'effettore (24F4S-Agly e 24F4A-Agly) non hanno mediato il CDC (Figura 23). B1B059 ha il potenziale per esaurire i pDC che portano BDCA2 in virtù della sua regione funzionale IgG1 di Fc. Sebbene B1B059 è in grado di attività citotossica nelle
20 cellule iperespressive di BDCA2, non si prevede che si esaurisca *in vivo* a causa della rapida, prolungata e quasi completa interiorizzazione del recettore dopo la ligazione di B1B059.

Example 31. Clonazione di un omologo BDCA2 di ratto e screening per il legame con B1B059

25

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Quando la sequenza di cDNA BDCA2 umana viene BLASTata rispetto alle sequenze di ratto nel database NCBI, l'omologo più vicino è Clec4b2 di ratto, descritto nel numero di accesso Genbank NM_001005896. Per determinare se il mAb guida di hu24F4 H4/L1 C95A era in grado di legarsi a un omologo di ratto di BDCA2 umano, i cDNA sono stati clonati e costruiti vettori di espressione per Clec4b2 di ratto e FcεR1γ di ratto. La sequenza di proteine Clec4b2 di ratto a lunghezza intera condivide solo il 51,0% di identità con BDCA2 umano. L'allineamento vuoto di BDCA2 umano (superiore) e Clec4b2 di ratto (inferiore) è mostrato di seguito:

```
1  MVPEEEPQDREKGLWFWQLKVWSMAVVSILLLSVCFTVSSVVPNFMYSK 50
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1  MMQEKLPOG . . KGGCW . TLRWLSAAVISMLLLSTCFIMSCVVTYQFMMEK 47
      . . . . .
51  TVKRLSKLREYQOYHPSLTCVMEGKDIED . . WSCCPTPWTSFQSSCYFIS 98
      : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
48  PMRRLSEL . . . HTYNSNFTCCSDGTMVSGKVVWSCCPKDWKPFGSHCYFTT 94
      . . . . .
99  TGMQSWTKSQKNCVSMGADLVVINTREEQDFIIQNLRNSSYFLGLSDPG 148
      . . | . . . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
95  DFVANWNESKEKCSHMGHLLVIHSQEEQDFINGILDTRWGYFTGLSDQ. 143
      . . . . .
149 GRRHWQWVDQTPYNENVTFWHSGEPNLDERCAIINFRSSEEWGWNNDIHC 198
      | . | | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
144 GQNQWQWIDQTPYNESVTFWHEDEPNNDYEKCV EINHKKDIGWGWNDDVVC 193
      .
10 199 HVPQKSICKMKKIYI 213 (SEQ ID NO:1)
      | | | | . | | | | :
194 SSEHRSICQVKKIYL 208 (SEQ ID NO: 82)
```

Clec4b2 di ratto è stato clonato da RT-PCR da cDNA di primo filamento

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

di milza di ratto con primer 5 'GAC CTT CTG AAT ATA TGC GGC CGC CAT
GAT GCA GGA AAA AC 3' (**SEQ ID NO: 83** (che aggiunge un sito *NotI* 5' e una
sequenza Kozak immediatamente prima della metionina di iniziatore *Clec4b2*) e
5' CCC ACA GCC ATG GAG GAC AGG ATC CTC ATA AGT ATA TTT TC 3'
5 (**SEQ ID NO: 84**) (che aggiunge un sito *BamHI* da 3' immediatamente dopo il
terminatore *Clec4b2*). Il prodotto RT-PCR da 0,64 kb è stato purificato e
subclonato nel vettore di clonazione pCR2.1TOPO di Invitrogen, producendo il
costrutto pCN815, il cui inserto era sequenziato. La mutagenesi del sito è stata
eseguita sul modello pCN815 con primer 5 'CAG GAT TTC ATC AAC GGA
10 ATC CTA GAC ACT CGT TGG G 3' (**SEQ ID NO: 85**) e il suo complemento
inverso, per correggere un errore PCR, risultante nel costrutto pCN822, la cui
sequenza proteica dedotta da *Clec4b2* è stata confermata identica a quella in
NM_001005896. Un vettore di espressione di mammifero per ratto *Clec4b2*
cDNA a lunghezza intera è stato costruito legando il frammento *NotI-BamHI* da
15 0,64 kb da pCN822 con i frammenti di catena principale vettoriale da 1,89 kb
BamHI-XbaI e 4,17 kb *XbaI-NotI* dal vettore di espressione pV90, per produrre il
vettore di espressione pCN834, la cui sequenza di inserimento cDNA è stata
confermata.

Il cDNA di *FcεRIγ* di ratto è descritto nel numero di accesso Genbank
20 NM_001131001. La sequenza proteica *FcεRIγ* di ratto condivide l'identità del
90,7% con *FcεRIγ* umano: l'allineamento, con umano (superiore) e ratto
(inferiore) è mostrato di seguito:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° U8BM-041R

1 MIPAVVLLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLTYCRLKIQV 50

|||||:| |||||:|||||

1 MIPAVILFLLLLLVEEAAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLTYCRLKIQV 50

51 RKAATSVEKSDGVYTGLSTRNQETETLKHEKPPQ 86 (SEQ ID NO: 2)

||| | | ||| |||||

51 RKADIASREKSDAVYTGLNTRNQETETLKHEKPPQ 86 (SEQ ID NO: 86)

Il cDNA di FcεR1γ di ratto è stato clonato da RT-PCR dal cDNA del primo
filamento di milza di ratto con primer 5 'CCC AGC GCT GCA GCC CGC GGC
CGC CAT GAT CCC AGC GGT 3' (SEQ ID NO: 87) (che aggiunge un sito *Not* I
5 e una sequenza Kozak immediatamente prima dell'inziatore metionina FcεR1γ)
e 5 'GAA CAC GTG TTG GGA TCC TAT TGG GGT TTC TC 3' (SEQ ID
NO: 88) (che aggiunge un 3' *Bam* Sito HI immediatamente dopo il terminatore
FcεR1γ). Il prodotto RT-PCR da 0,27 kb è stato purificato e subclonato nel
vettore di clonazione pCR2.1TOPO di Invitrogen, producendo il costrutto
10 pCN816, il cui inserto è stato sequenziato e ha confermato di essere identico a
quello in NM-001131001. Il frammento 0,27 kb *Not*I -*Bam* HI da pCN816 è stato
legato ai frammenti di catena principale vettoriali 0,66 kb *Bam* HI -*Xho* I e 4,16
kb *Xho*I-*Not*I da pBHS103, per costruire il vettore di espressione dei mammiferi
pCN844, di cui è stata confermata la sequenza di inserti cDNA FcεR1γ di ratto.

15 Per determinare se il mAb hu24F4 H4/L1 C95A guida era in grado di
legarsi Clec4b2 di superficie di ratto, le cellule 293E erano co-trasfettate con un
vettore di espressione reporter EGFP (pEAG1458) e con i vettori umani
BDCA2/FcεR1γ (pEAG2420 e pEAG2413) o vettori Clec4b2/FcεR1γ di ratto
(pCN834 e pCN844) con rapporti molarli 1:1:1. A 3 giorni le cellule post-
20 trasfezione sono state raccolte e colorate con il mAb di hu24F4 H4/L1 C95A

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

guida in un saggio di legame diretto FACS titolazione diluizione, gating su cellule vive EGFP positive. Sebbene sia stato osservato un legame ad alta affinità di hu24F4 con il BDCA2 umano di superficie, non è stato rilevato alcun legame con Clec4b2 di superficie di ratto. Questo indica che hu24F4 non ha reattività incrociata con l'omologo di ratto più vicino al BDCA2 umano.

Esempio 32. La somministrazione di BIIB059 a macachi cinomolghi sani provoca la perdita di BDCA2 dalla superficie cellulare dendritica plasmocitoide, probabilmente attraverso l'internalizzazione

Per valutare se i livelli di superficie di BDCA2 sono cambiati con la somministrazione di BIIB059 ai macachi cinomolghi, sono stati utilizzati due saggi. Il primo saggio, il cosiddetto metodo "diretto", rileva la BIIB059 legata alla superficie con un anticorpo secondario anti-umano marcato con PE. Idealmente, un anticorpo non bloccante crociato per BDCA2 sarebbe usato per rilevare BDCA2 totale; tuttavia, un tale anticorpo non esiste. Pertanto, nel secondo saggio, il cosiddetto metodo "indiretto", BDCA2 non occupato viene rilevato attraverso l'aggiunta di BIIB059 coniugato ad A647.

Prima della somministrazione di qualsiasi articolo di prova, per ogni macaco cinomolgo, l'intensità media massima di fluorescenza (MFI) per il legame BIIB059 con i pDC è stata stabilita in 3 diversi punti temporali (settimane -3, -2 e -1 prima dell'iniezione singola di BIIB059). Ad ogni punto temporale, la titolazione di BIIB059 senza etichetta (da 40 a 0,04 µg/mL concentrazione finale) è stata aggiunta alle aliquote di sangue e BIIB059 è stato rilevato utilizzando un anticorpo secondario marcato con PE (metodo "diretto") o BDCA2 libero valutato con BIIB059 -A647 (metodo "indiretto"). I valori massimi sono stati presi dai valori sul plateau di ciascun dosaggio (Figure 24 e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

25). La valutazione dei valori ha rivelato una fluttuazione molto modesta dell'MFI massimo per ogni macaco cinomolgo, con una maggiore variazione tra i macachi cinomolghi, dimostrando che la densità BDCA2 sui pDC nel macaco cinomolgo è variabile (Tabella 2).

5 **Tabella 2.** *Riepilogo del legame medio EC50 di B1B059 alla superficie cellulare BDCA2 su PDC nel sangue intero di macaco cinomolgo*

Il sangue intero veniva prelevato da dodici macachi cinomolghi, una volta alla settimana per tre settimane in totale. Il sangue è stato incubato con varie concentrazioni di B1B059 IgG1 umana (da 0,04 a 40 ug/mL, curva a 6 punti, diluizioni 1:4 volte). i pDC sono stati identificati usando la citometria a flusso come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR + e trattati con IgG anti-umane marcate secondariamente per rilevare B1B059 legato al recettore BDCA2 su pDC. L'MFI di PE è stata calcolata con il software FlowJo e le curve EC50 sono state generate nel software GraphPad Prism.

Donatore di macaco cinomolgo	EC50 (ug/mL)
1	0,81
2	1
3	0,95
4	1,7
5	0,71
6	1,3
7	1,1
8	1,2



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I./n° USBM-041R

9	1,4
10	1,2
11	1,4
12	1,6
media	1,2
SD	0,3
* media di 2-3 esperimenti	

Dopo la somministrazione del veicolo, non è stato trovato alcun BIIB059 come previsto e non sono stati rilevati cambiamenti significativi nei livelli di BDCA2 valutati mediante legame di BIIB059-A647 (10 µg/mL) (Figura 26).

5 Dopo la somministrazione endovenosa (IV) di BIIB059 a 10 mg/kg o 1 mg/kg, nessun BIIB059 è stato rilevato sulla superficie, anche dopo 1 ora dopo l'iniezione di BIIB059 (Figure 27 e 28). Inoltre, non vi era alcun BDCA2 libero valutato in base alla mancanza di BIIB059-A647 per 38 giorni per tutte i macachi cinomolghi trattati, ad eccezione del macaco cinomolgo 5; le
10 concentrazioni sieriche in questo macaco cinomolgo sono diminuite rapidamente il giorno 10, probabilmente a causa dell'immunogenicità sviluppata contro BIIB059.

Dopo somministrazione sottocutanea di una dose inferiore di BIIB059 (0,2 mg/kg), BIIB059 è stato brevemente osservato sulla superficie dei pDC (a 1
15 ora, è scomparso di 6 ore). Allo stesso punto temporale (1 ora), è stato osservato un certo BDCA2 libero (13%, 74%, 72% dell'MFI basale). Ancora una

Ing. 
Consulente in P.A. n° USBM-041R

volta, nessun farmaco è stato rilevato per tutto il resto dello studio e nessun recettore BDCA2 libero è stato rilevato fino al 14° giorno post iniezione BIIB059 (Figura 29).

In tutti i macachi cinomolghi, la ricomparsa del BDCA2 libero ha coinciso con un calo dei livelli sierici di farmaco al di sotto di 1 µg/mL (Figure 30 e 31). Pertanto, 1 µg/mL sembra essere la concentrazione minima di BIIB059 necessaria per mediare l'internalizzazione di tutta la BDCA2 di superficie.

La Tabella 3 riassume l'internalizzazione EC₁₀, EC₅₀ ed EC₉₀ del recettore BDCA2 su pDC dopo legatura con BIIB059 nel sangue intero di macaco cinomolgo. Le curve EC₁₀₋₅₀₋₉₀ sono state generate nel software GraphPad Prism utilizzando un adattamento a quattro parametri.

Macaco cinomolgo	Via	Dose (mg/kg)	EC10 (ug/mL)	EC50 (ug/mL)	EC90 (ug/mL)
5	IV	1	0,003	0,087	0,370
6	IV	1	0,022	0,025	0,055
7	IV	1	0,014	0,090	0,580
3	IV	10	0,100	0,150	0,220
8	IV	10	0,095	0,370	1,455
10	IV	10	0,114	0,126	0,265
4	SC	0,2	0,078	0,088	0,100
6	SC	0,2	0,040	0,046	0,054
12	SC	0,2	0,114	0,121	0,129
Media			0,064	0,123	0,359
Dev. standard			0,045	0,101	0,445

Per riassumere, gli esperimenti descritti in questo esempio mostrano che: La somministrazione *in vivo* IV di dosi elevate (10 e 1 mg/kg) di BIIB059 ha portato alla rapida scomparsa sia del BDCA2 disponibile sia del farmaco legato dalla superficie cellulare, suggerendo l'internalizzazione del recettore. La

somministrazione sottocutanea di una dose bassa (0,2 mg/kg) di BIIIB059 ha comportato una rilevazione molto transitoria (a 1 ora) di BIIIB059 sulla superficie del pDC. Entro 6 ore, nessun BIIIB059 era rilevabile sulla superficie della cellula pDC. La ricomparsa del BDCA2 disponibile sulla superficie cellulare si è verificata quando l'esposizione al farmaco è diminuita al di sotto di 1 µg/mL.

Esempio 33: BIIIB059 inibisce i mediatori pro-infiammatori in aggiunta a tutti i tipi di IFN di tipo I.

La ligazione BDCA2 sopprime la capacità dei pDC di produrre IFN di tipo I in risposta ai ligandi TLR (si veda la Figura 16). Per confermare l'attività inibitoria del mAb anti-BDCA2, BIIIB059, i pDC purificati da donatori umani sani sono stati stimolati con il ligando sintetico TLR9, CpG-A, in presenza di 10 µg/mL di BIIIB059 o mAb di controllo isotipico. In particolare, i pDC di donatori sani umani sono stati isolati utilizzando una procedura di separazione magnetica in due fasi (kit MACS, Miltenyi Biotec). 5 x10⁴ pDC/pozzetti umani purificati sono stati lasciati non trattati (Media) o sono stati stimolati con ligando TLR9 1µM (CPG-A) in presenza di 10 µg/mL di BIIIB059 (CpG-A + BIIIB059) o controllo isotipico (CpG- A + Iso). Le piastre contenenti pDC sono state incubate per 18 ore a 37 °C e i supernatanti sono stati raccolti per l'uso in saggi ELISA o multiplex per misurare le concentrazioni di citochine infiammatorie e chemochine. Questi esperimenti hanno dimostrato che BIIIB059 ha inibito potentemente l'IFNα indotto dal TLR9 e altre citochine derivate dal pDC come TNFα e IL-6, nonché le chemochine indotte dal TLR-9 come CCL3, CCL4, CCL5 (Figura 32).

È stata anche studiata la capacità di BIIIB059 di inibire la produzione di IFNα e mediatori pro-infiammatori a seguito di stimolazione con un ligando



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I/n° USBM-041R

fisiologicamente rilevante, complessi immunitari. In particolare, i complessi immunitari Sm/RNP (IC) sono stati preformati mescolando sm-RNP dal timo di vitello e anticorpi anti-RNP purificati da sieri di pazienti affetti da LES per 1 ora in terreno privo di siero. Le pDC da donatori sani umani sono state isolate
5 utilizzando una procedura di separazione magnetica in due fasi (kit MACS, Miltenyi Biotec). 5×10^4 pDC/pozzetto sono stati lasciati non trattati (Media) o sono stati stimolati con IC Sm/RNP preformato in presenza di $10 \mu\text{g/mL}$ di BIIB059 (IC + BIIB059) o controllo isotipo (IC + Iso). Le piastre contenenti pDC sono state incubate per 18 ore a 37°C e i supernatanti sono stati raccolti per
10 l'uso in saggi ELISA o multiplex per misurare le concentrazioni di citochine infiammatorie e chemochine. Questi studi hanno dimostrato che BIIB059 ha inibito potentemente l'IFN α indotto dai complessi immunitari Sm/RNP e altre citochine derivate dal pDC come TNF α e IL-6. BIIB059 ha anche inibito le chemochine indotte dai complessi immunitari Sm/RNP, come CCL3 e CCL4
15 (Figura 33).

Esempio 34: BIIB059 inibisce la trascrizione indotta da Sm/RNP IC di sottotipi di tipo I IFN da parte di pDC umane purificate

Tredici sottotipi di IFN α e un singolo membro di IFN β esistono negli
20 esseri umani. L'effetto di BIIB059 sulla trascrizione dei sottotipi IFN di tipo I nelle pDC stimulate IC Sm/RNP da donatori umani sani è stato valutato usando saggi qualitativi di reazione a catena della polimerasi (qPCR).

In particolare, i complessi immunitari Sm/RNP (IC) sono stati preformati mescolando sm-RNP dal timo di vitello e anticorpi anti-RNP purificati da sieri di
25 pazienti affetti da LES per 30 ore in terreno privo di siero. Le pDC da donatori


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sani umani sono state isolate utilizzando una procedura di separazione magnetica in due fasi (kit MACS, Miltenyi Biotec). $7,5 \times 10^5$ pDC purificate umane/pozzetto sono state lasciate non trattate (Media) o sono stati stimolati con IC Sm/RNP preformato in presenza di $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ di BIIB059 (IC + BIIB059) o controllo isotipo (IC + Iso). Le piastre contenenti pDC sono state incubate per 16 ore a 37°C e $5\% \text{CO}_2$. Sono state raccolte cellule pDC e l'RNA da pDC è stato isolato per la valutazione nella reazione qPCR.

Questo esperimento ha dimostrato che il trattamento con BIIB059 ha inibito il livello di trascrizione di tutti i sottotipi IFN di tipo I testati (Figura 34).

10 **Esempio 35: BIIB059 inibisce la produzione di IFN α indotta da TLR9 da PBMC umane da donatori sani e pazienti affetti da LES**

Le pDC sono i principali produttori di IFN in risposta alla stimolazione TLR7 e TLR9. Le pDC possono produrre mille volte più IFN rispetto a qualsiasi altro tipo di cellula. Questo esperimento studia se BIIB059 potrebbe inibire la produzione di IFN α indotta da TLR9 nelle colture di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) senza la necessità di isolamento pDC. PBMC da donatori umani sani o pazienti affetti da LES sono stati stimolati con 1 o $5 \mu\text{M}$ del ligando TLR9 (CpG-A) e trattati con concentrazioni di BIIB059 comprese tra $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $2 \text{ng}/\text{mL}$ in un volume di dosaggio totale di $250 \mu\text{L}/\text{bene}$. Le piastre sono state incubate durante la notte (18 ore) a 37°C e 5% di CO_2 . I surnatanti sono stati raccolti per la valutazione nei saggi ELISA di IFN α .

Questo esperimento ha dimostrato che BIIB059 ha inibito la produzione di IFN α indotta da TLR9 da PBMC da donatori sani con un IC_{50} medio di $0,04 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 35A e 35C). BIIB059 ha mostrato una potenza simile nell'inibire la produzione di IFN α indotta da TLR9 da PBMC da pazienti con LES

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

con un IC₅₀ medio di 0,03 +/- 0,01 µg/mL (Figura 35B e 35C).


Esempio 36: BIIB059 inibisce la produzione di IFNα nel sangue intero stimolata con il ligando TLR9

L'attività di BIIB059 è stata anche valutata in analisi del sangue intero (WBA). Il sangue intero proveniente da donatori umani sani è stato stimolato con il ligando TLR9 in presenza di concentrazioni crescenti di BIIB059 e l'IC₅₀ di inibizione è stata calcolata per ogni singolo donatore. In particolare, il sangue intero proveniente da donatori umani sani è stato incubato con concentrazioni crescenti di BIIB059 che variavano da 10 µg/mL a 2 ng/mL o controllo dell'isotipo in un volume di dosaggio totale di 200 µL/pozzetto. CpG-A è stato aggiunto a 75µg/mL (parentesi quadra), che è risultato essere ottimale per la stimolazione della produzione di IFNα nel sangue intero. Le piastre sono state incubate per 18 ore a 37 °C e i surnatanti sono stati raccolti per l'uso nei test ELISA IFNα (PBL InterferonSource).

BIIB059 ha mostrato un'inibizione dose-dipendente della produzione di IFNα indotta da TLR9 nei test del sangue intero e ha mostrato IC₅₀ simile a quello osservato con colture PBMC (Figura 36).

Esempio 37: BIIB059 non inibisce la produzione di IFNα indotta da TLR3 da PBMC umana da donatori umani sani

Questo esperimento è stato eseguito per determinare se altri tipi di cellule attivate con diversi ligandi TLR sono ancora in grado di produrre IFN di tipo I anche in presenza di BIIB059. TLR3 non è espresso in pDC e quindi il ligando TLR3 non induce la produzione di IFN da parte di pDC. PBMC da donatori sani umani sono state stimolate con poli: IC, che è un ligando TLR3 che può indurre potentemente l'IFN di tipo I principalmente dai monociti. In


Ing. Indes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

particolare, le PBMC di donatori umani sani sono stati stimolati con 1 μ M del
ligando TLR3 (Poly I: C) e trattati con concentrazioni di BIIB059 comprese tra
10 μ g/mL e 0,5 ng/mL in un volume di dosaggio totale di 250 μ L/pozzetto in una
piastra a 96 pozzetti. Le piastre sono state incubate durante la notte (18 ore) a
5 37 °C e 5% di CO₂. 200 μ l di surnatanti sono stati raccolti per la valutazione dei
livelli di IFN α mediante ELISA. Come mostrato nella Figura 37, BIIB059 non ha
influenzato la produzione di IFN α indotta da TLR3 da PBMC da donatori umani
sani.

Per riassumere, gli Esempi 33-37 mostrano che BIIB059 può inibire
10 potentemente l'interferone di tipo I stimolato da TLR 9 mediante pDC, PBMC e
colture di sangue intero purificati. BIIB059 è altrettanto efficace nell'inibire
l'interferone di tipo I indotto da TLR9 da pDC da donatori umani sani e pazienti
affetti da LES. Oltre a inibire l'IFN di tipo I, BIIB059 può inibire la produzione di
altre citochine e chemochine derivate dal pDC. BIIB059 inibisce specificamente
15 l'IFN di tipo I indotto da TLR9 dai pDC e non influisce sulla produzione di IFN da
parte di altri tipi di cellule attivati con un diverso ligando TLR. Pertanto, i dati *in*
vitro forniti nel presente contesto supportano l'attività farmacologica e la
potenza di BIIB059 oltre alla sua specificità per IFN di tipo I indotto da TLR7/9
dai pDC.

20 **Esempio 38: BIIB059 media l'internalizzazione BDCA2 su pDC umane**

Per determinare se BIIB059 induce l'internalizzazione di BDCA2, il
sangue intero umano di 10 donatori umani sani è stato incubato con
concentrazioni crescenti di BIIB059 a 37 °C per 16 ore. La superficie cellulare
rimanente BDCA2 è stata rilevata utilizzando un mAb anti-BDCA2 non
25 bloccante senza marcatura FITC (clone 2D6).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

In particolare, il sangue intero proveniente da 10 donatori umani sani è stato incubato con concentrazioni crescenti di BIIB059 o 10 µg/mL di anticorpo di controllo isotipico per 16 ore a 37 °C e 5% di CO₂ e quindi incubato per 30 minuti a 4 °C con FITC anti-BDCA2 mAb (clone 2D6) senza etichetta con
5 blocco incrociato, anti-HLA-DR, anti-CD123, anti-CD14 e anti-CD20. Il sangue intero è stato quindi incubato per 30 minuti a 4 °C con 50 µL di una soluzione colorante, che includeva i seguenti mAb: mAb anti-BDCA2 senza blocco incrociato marcato con FITC (clone 2D6), anti-HLA-DR, anti-CD123, anti-CD14 e anti-CD20. I globuli rossi (globuli rossi) sono stati lisati utilizzando 1X
10 tampone di lisi/tampone di fissaggio (BD Bioscience).

Come mostrato nella Figura 38, BIIB059 ha portato a una riduzione dose-dipendente dell'intensità della colorazione 2D6 marcata con FITC con un EC₅₀ medio di 0,017 ± 0,005 µg/mL

Esempio 39: BDCA2 viene rapidamente interiorizzato dopo la ligazione con BIIB059

Per determinare la cinetica dell'interiorizzazione BDCA2 indotta da BIIB059, il sangue intero umano è stato incubato con diverse concentrazioni di BIIB059 a 37 °C per vari periodi. In particolare, il sangue intero è stato trattato con 10, 1, 0,1 o 0,01 µg/mL di BIIB059 o un anticorpo di controllo isotipico (10
20 µg/mL) a 37 °C per i periodi indicati. Il sangue intero è stato quindi incubato per 30 minuti a 4 °C con 50 µL di una soluzione colorante, che includeva i seguenti mAb: mAb anti-BDCA2 senza blocco incrociato marcato con FITC (clone 2D6), anti-HLA-DR, anti-CD123, anti-CD14 e anti-CD20. I globuli rossi (globuli rossi) sono stati lisati utilizzando 1X tampone di lisi/tampone di fissaggio (BD
25 Bioscience). Come mostrato nella Figura 39, dopo incubazione con BIIB059 a 1


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R


µg/mL l'intensità della colorazione 2D6 marcata con FITC è rapidamente diminuita raggiungendo i livelli di fondo entro un'ora dall'incubazione. L'incubazione con una concentrazione di BIIIB059 inferiore di dieci volte (0,1 µg/mL) ha ritardato l'internalizzazione di BDCA2 di 2 ore. Questi dati mostrano
5 che il tasso di internalizzazione BDCA2 dipende dalle dosi di BIIIB059.

Esempio 40: BIIIB059 induce l'internalizzazione BDCA2 nelle cellule dendritiche plasmacitoidi umane

Per visualizzare l'internalizzazione di BDCA2 dopo la legatura con BIIIB059, i pDC purificati sono stati incubati con BIIIB059 marcato con A647 e
10 analizzati mediante microscopia confocale. Come previsto, BDCA2 è stato localizzato sulla superficie cellulare dei pDC a 4 °C. Dopo una breve incubazione a 37 °C, BDCA2 è stato chiaramente rilevato all'interno delle cellule (Figura 40).

Esempio 41: L'internalizzazione non altera l'inibizione mediata da BIIIB059 della produzione di IFN-α

Questo esperimento ha studiato se l'internalizzazione BDCA2 altera la capacità di BIIIB059 di inibire la produzione di IFNα indotta da TLR9 dai pDC. Le cellule sono state preincubate con BIIIB059 a 37 °C per vari periodi corrispondenti alla massima internalizzazione BDCA2 e quindi stimulate con
20 ligando TLR9 per ulteriori 18 ore. In particolare, il sangue intero è stato raccolto da sangue venoso eparinizzato di donatori sani e pre-incubato con BIIIB059 o anticorpo di controllo isotopico per la durata indicata. A ogni punto temporale successivo alla pre-incubazione, le cellule sono state stimulate con 200 µg/mL di ligando TLR9 (CpGA) e incubate per altre 18 ore a 37 °C. I surnatanti sono
25 stati raccolti per l'uso nei test ELISA IFNα (PBL InterferonSource). Come


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mostrato nella Figura 41, la pre-incubazione con BIIIB059 (fino a 9 ore) non ha alterato la capacità di BIIIB059 di inibire la produzione di IFN α indotta da TLR9 nei test del sangue intero da donatori umani sani. Questi dati suggeriscono che potrebbe essere necessaria l'internalizzazione BDCA2 per l'inibizione della segnalazione TLR9.

Esempio 42: L'EC50 di internalizzazione BDCA2 mediata da BIIIB059 su pDCs si collega con IC50 di BIIIB059-Inibizione mediata di IFN α indotta da TLR9 da pDC in analisi di sangue intero

Per esplorare ulteriormente il legame tra l'internalizzazione di BDCA2 e l'inibizione della segnalazione TLR9, la potenza dell'internalizzazione mediata da BIIIB059 di BDCA2 su pDC e l'inibizione della produzione di IFN α mediata da TLR da parte di pDC sono state confrontate in 10 donatori umani sani.

Per valutare l'internalizzazione BDCA2 mediata da BIIIB059, il sangue intero è stato incubato con BIIIB059 per 16 ore. Il sangue intero è stato quindi raccolto, lisato e l'espressione di BDCA2 è stata valutata mediante citofluorimetria usando l'anticorpo 2D6 non bloccante coniugato con FITC. Per valutare l'inibizione mediata da BIIIB059 dell'IFN α indotta da TLR9 da pDC, il sangue intero è stato incubato con concentrazioni crescenti di BIIIB059 per 16 ore in presenza di un ligando TLR9. I surnatanti sono stati raccolti e valutati per IFN α da ELISA. L'EC50 di internalizzazione BDCA2 mediata da BIIIB059 era 0,02 μ g/mL. L'IC50 dell'inibizione mediata da BIIIB059 dell'IFN α indotta da TLR9 era 0,07 μ g/mL. È stata osservata una correlazione tra EC50 di internalizzazione mediata da BIIIB059 di BDCA2 e IC50 di inibizione di BIIIB059 IFN α con un valore R quadrato di 0,57 (Figura 42).

Esempio 43: L'attivazione TLR9 induce la colocalizzazione BDCA2 con

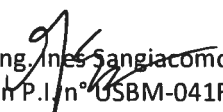
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

TLR9 e con il marcatore lisosomiale LAMP1

Per verificare l'ipotesi che l'inibizione TLR9 mediata da BIIIB059 richieda l'interiorizzazione e la localizzazione di BDCA2 in compartimenti endosomiali/lisosomiali contenenti TLR9, è stata utilizzata la microscopia confocale per seguire la distribuzione intracellulare di BDCA2 dopo la ligazione BIIIB059. I pDC umani purificati sono stati coltivati per 7 giorni e incubati con BIIIB059 marcato con A647 per 15 minuti a 37 °C. Durante gli ultimi 10 minuti di incubazione, le cellule sono state trattate con 1µM del ligando TLR9 CpG-A o lasciate non trattate. Le cellule sono state colorate con anticorpi marcati in modo fluorescente a TLR9 e il marker endosomiale/lisosomiale tardivo, LAMP1, e analizzate mediante microscopia confocale.

TLR9 è stato reclutato in un compartimento endosomiale/lisosomiale tardivo dopo stimolazione con ligando TLR9, come evidenziato da una maggiore colocalizzazione di TLR9 con LAMP1 (Figura 43). La stimolazione TLR9 ha anche aumentato significativamente la frazione di colocalizzazione di BDCA2 con TLR9 e LAMP1. Questi risultati suggeriscono che BIIIB059, quando legato a BDCA2, si localizza preferenzialmente in compartimenti intracellulari dove è presente TLR9 attivato.

In sintesi, gli esempi 38-43 mostrano che BIIIB059, un anticorpo monoclonale umanizzato contro BDCA2, impegna BDCA2 e porta alla sua interiorizzazione. Alla stimolazione, BDCA2 colocalizza con TLR9 nel compartimento endosomiale/lisosomiale dove media l'inibizione della segnalazione TLR9. Questi dati suggeriscono che l'internalizzazione BDCA2 è un passaggio necessario per mediare l'inibizione dei mediatori pro-infiammatori indotti da TLR9 da parte dei pDC.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Esempio 44: Effetto di BIIB059 sui livelli di CD62L

Le pDC circolanti esprimono alti livelli di CD62L (L-selectina) e ospitano il tessuto linfoide contenente alte venule endoteliali (HEV). PNA_d è un ligando per CD62L che è espresso in modo costitutivo su HEV e media l'homing delle
5 cellule che esprimono CD62L nel tessuto linfoide organizzato. È stato scoperto che PNA_d è espresso dalle cellule endoteliali cutanee nelle lesioni cutanee dell'eritematosi del lupus. In virtù della loro espressione di CD62L, le pDC potrebbero essere reclutate nei tessuti periferici infiammati che esprimono PNA_d.

10 Per determinare se BIIB059 influisce sull'espressione di CD62L sulla superficie delle pDC umani, il sangue intero è stato trattato con diverse concentrazioni di BIIB059 per 1 ora a 37 °C senza stimolazione. In particolare, il sangue intero proveniente da donatori umani sani è stato trattato con concentrazioni crescenti di BIIB059 per 1 ora a 37 °C e 5% di CO₂. L'MFI di
15 CD62L è stata determinata mediante gating su pDC come definito da CD14⁻, CD20⁻, HLA-DR⁺ e CD123⁺.

BIIB059 ha causato una diminuzione dose-dipendente nell'espressione di CD62L sulla superficie dei pDC umani, valutata mediante citofluorimetria (Figura 44). La stimolazione di pDC con ligando TLR non ha influenzato
20 l'espressione di CD62L (Figura 44A).

Esempio 45: Il trattamento di PBMC con GM6001 inibisce lo spargimento di CD62L mediato da BIIB059 dalla superficie delle pDC umane

È noto che la metalloproteinasi induce lo spargimento di CD62L dalla superficie delle cellule immunitarie. Per studiare se le metalloproteinasi sono
25 coinvolte nella riduzione della CD62L mediata da BIIB059, le PBMC sono state

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

preparati da donatori umani sani e pretrattati con GM6001 (un inibitore della metalloproteinasi) per 30 minuti a 37 °C e 5% di CO₂, seguito dall'aggiunta di 10 µg/mL di BII059 per 1 ora. L'espressione superficiale di CD62L è stata valutata mediante citofluorimetria. GM6001 ha inibito il CD62L di modulazione discendente mediata da BII059 in modo dose-dipendente (Figura 45). Questi dati suggeriscono che BII059 induce lo spargimento di CD62L in modo dipendente dalla metalloproteinasi.

In sintesi, gli Esempi 44 e 45 mostrano che BII059 riduce l'espressione di CD62L sulla superficie delle pDC umane. La sottomodulazione di CD62L mediata da BII059 è inibita dall'inibitore della metalloproteinasi (GM6001) indicando che BII059 induce lo spargimento di CD62L dalla superficie delle pDC umane attraverso, almeno in parte, l'attivazione delle metalloproteinasi. Si prevede pertanto che il trattamento BII059 riduca o prevenga il traffico di pDC verso gli organi bersaglio nella LES.

Esempio 46: Impatto della regione Fc di BII059 sulla produzione di IFN mediata da immunocomplessi da parte di cellule dendritiche plasmocitoidi

Il recettore gamma Fc IIA (CD32a) è una proteina della superficie cellulare che lega le IgG a bassa affinità. Le cellule dendritiche plasmocitoidi umane esprimono esclusivamente il recettore gamma Fc IIA, CD32a. La stimolazione di pDC con complessi immunitari ha dimostrato di dipendere da CD32. I complessi immunitari sono interiorizzati da CD32 e stimolano il TLR7/9 endosomiale per indurre la produzione di IFN da parte delle pDC.

Per determinare l'effetto di BII059 sull'espressione della superficie del CD32a, le pDC isolate sono state trattate con concentrazioni crescenti di BII059 o la forma aglicosilata dell'anticorpo, 24F4-A, e incubati per 16 ore a 37


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

°C. Le pDC sono state quindi colorate con BDCA2 marcato FITC e anti-CD32 marcato PE (clone AT10) e l'espressione superficiale di BDCA2 e CD32 è stata valutata mediante citofluorimetria. B1B059 e la versione agly, 24F4-A, erano ugualmente potenti nella loro capacità di indurre l'internalizzazione BDCA2 (Figura 46A). Solo B1B059 è stato in grado di indurre la modulazione discendente del CD32 sulla superficie cellulare delle pDC come indicato dalla riduzione dose-dipendente dell'intensità fluorescente media CD32 (MFI) (Figura 46B-D). Il trattamento con controllo isotopico competente per effettori non ha avuto effetti sui livelli di superficie del CD32 (Figura 46). Questi dati indicano che la modulazione verso il basso mediata da B1B059 dei livelli di CD32a sulla superficie delle pDC è specifica per il legame della regione Fc di B1B059.

Per garantire che il legame della regione Fc di B1B059 non si limiti a mascherare l'epitopo di CD32 riconosciuto dal FITC marcato con anti-CD32 mAb, i pDC sono stati trattati con 10 µg/mL di B1B059 per 1 ora a 4 °C o 37 °C e quindi colorato con marcatura anti-CD32. Come mostrato in Fig. 46E, il trattamento con B1B059 a 4 °C non ha diminuito l'MFI CD32 indicando che il trattamento con B1B059 non interferisce con il legame di mAb anti-CD32 marcato. Il fatto che la sottomodulazione del CD32a si sia verificata solo durante l'incubazione con B1B059 a 37 °C suggerisce che il CD32a potrebbe essere perso dalla superficie cellulare delle pDC.


Per determinare se la modulazione del CD32a da parte di B1B059 ha un impatto biologico, le pDC sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti di B1B059 o della forma aglicosilata, 24F4A-Agly, e stimulate con complessi immunitari o con il ligando sintetico TLR9 (CPG-A). Come previsto, B1B059 e 24F4A-Agly erano indistinguibili nella loro capacità di inibire l'IFN α


Ing. Ives Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

indotto da CPG-A dalle pDC, che è indipendente da CD32 (Figura 47A). Vi era una netta separazione in potenza tra BIIB059 e 24F4A-agly quando le pDC erano stimulate con complessi immunitari. BIIB059 ha inibito l'IFN α indotto dal complesso immunitario con un IC50 di 0,04 rispetto a un IC50 di 1,4 μ g/mL di 24F4A-Agly. (Figura 47B). Questi dati indicano che BIIB059 modula in modo discendente il CD32a in virtù del suo Fc funzionale e quindi inibisce la stimolazione delle pDC da parte dei complessi immunitari.

Per confermare che la sottomodulazione di CD32a era unica per BIIB059, abbiamo studiato l'effetto di un anticorpo anti-CD40 completamente umanizzato sui livelli di CD32 e la produzione di IFN α mediata dal sistema immunitario da parte delle pDC. CD40 è una proteina della superficie cellulare espressa in pDC. Un anticorpo anti-CD40 con un Fc completamente funzionale ha la capacità di impegnare CD40 e legare CD32 sulla superficie delle pDC. Il trattamento con mAb anti-CD40 non ha avuto alcun effetto sull'espressione della superficie del CD32 e nessun effetto significativo sulla produzione di IFN α da pDC stimolati dal sistema immunitario (Figura 48A e B). Il legame dell'anti CD40mAb è stato confermato dimostrando l'impegno massimo del CD40 nelle cellule trattate con anti-CD40 (Figura 48C).

Come mostrato in precedenza, la ligazione di BDCA2 con BIIB059 o la forma aglicosilata 24F4A-Agly porta all'internalizzazione dei recettori e all'inibizione dell'IFN α indotta da TLR9 da parte delle pDC. In questo studio mostriamo che BIIB059 causa la modulazione in giù del CD32a sulle pDC e l'inibizione della produzione di IFN α stimolata dal sistema immunitario da parte delle pDC in modo dipendente dall'Fc. La sottomodulazione di CD32a innescata da BIIB059 non deriva da un qualsiasi anticorpo con un Fc funzionale in grado


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

di legare una molecola di superficie cellulare espressa su pDC. Questo studio evidenzia il nuovo potenziale terapeutico di un mAb anti-BDCA2 competente per l'effettore, che può smorzare le risposte di pDC attraverso le sue regioni Fab'2 e Fc, migliorando l'efficacia.


5 **Esempio 47: Interazione di BIIB059 con idrossiclorochina (HCQ)**

Agenti antimalarici, come l'idrossiclorochina (HCQ), sono stati utilizzati nel trattamento della LES. Le pDC dei pazienti con LES trattati con HCQ hanno una ridotta capacità di produrre IFN α dopo stimolazione con ligandi TLR7 e TLR9. Poiché sia BIIB059 che HCQ hanno un impatto sull'IFN α indotto da
10 TLR7/9 nei pDC, è stato valutato se l'effetto di BIIB059 e HCQ potesse essere ridondante.

Per rispondere a questa domanda, le PBMC umane sono state preparate dal sangue di donatori sani e stimolate con ligandi TLR7 o TLR9 in presenza di concentrazioni variabili di BIIB059 da solo, HCQ da solo o BIIB059 in
15 combinazione con HCQ. I surnatanti sono stati raccolti dopo 18 ore e analizzati per l'IFN α dall'ELISA. L'aggiunta di HCQ ha aumentato la potenza di BIIB059 e ha portato a un effetto inibitorio additivo sulla produzione IFN α indotta da TLR7 e TLR9 da parte di PBMC da donatori umani sani. Questi dati dimostrano che
20 l'attività di BIIB059 e HCQ non sono ridondanti ed evidenziano l'ulteriore vantaggio terapeutico di BIIB059 quando somministrato con composti antimalarici come HCQ.

Esempio 48: Effetto di BIIB059 su pDC che esprimono BDCA2 *in vivo*

L'obiettivo di questo studio era determinare se la somministrazione di BIIB059 al macaco cinomolgo media l'esaurimento delle pDC nel sangue
25 periferico.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

Quattro sanguinamenti di dosaggio pre-BIIB059 sono stati raccolti a intervalli settimanali da dodici macachi cinomolghi per stabilire una frequenza pDC basale per ciascun animale (Tabella 3).

Tabella 3. Riassunto delle frequenze medie di PDC circolanti nel sangue intero di macachi cinomolghi sani.

Il sangue intero veniva prelevato da dodici macachi cinomolghi una volta alla settimana per un totale di quattro settimane. Le pDC sono state identificate usando la citometria a flusso come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR +. La pDC come percentuale delle cellule CD20-CD14 è stata calcolata con il software FlowJo.

Donatore di macaco cinomolgo	percentuale di PDC circolante					
	073112	080712	081312	082013	media	SD
1	0,26	0,2	0,15	0,16	0,19	0,05
2	0,2	0,15	0,15	0,21	0,18	0,03
3	0,11	0,06	0,11	0,19	0,12	0,05
4	0,12	0,11	0,14	0,31	0,17	0,09
5	0,19	0,2	0,31	0,40	0,28	0,10
6	0,32	0,57	0,35	0,39	0,41	0,11
7	0,15	0,19	0,21	0,16	0,18	0,03
8	0,12	0,13	0,1	0,16	0,13	0,03
9	0,08	0,12	0,1	0,11	0,10	0,02

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

10	0,16	0,15	0,28	0,22	0,20	0,06
11	0,06	0,07	0,04	0,07	0,06	0,01
12	0,1	0,05	0,07	0,16	0,10	0,05
media	0,16	0,17	0,17	0,21	0,18	
SD	0,08	0,14	0,10	0,10	0,09	

In tutte le analisi statistiche, le frequenze pDC sono state trasformate in tronchi per ridurre l'asimmetria (Figura 51). La distribuzione originale delle frequenze pDC nel pannello di sinistra della Figura 51 era gravemente inclinata a destra. Tuttavia, dopo una trasformazione logaritmica, la distribuzione delle frequenze pDC trasformate (Figura 51, pannello di destra) seguiva approssimativamente una distribuzione normale. Questi dati trasformati in log sono stati utilizzati per tutti i metodi di analisi statistica. La Figura 52 mostra i livelli di pDC su scala logaritmica per ogni macaco cinomolgo su quattro punti temporali prima dell'iniezione IV. Utilizzando un modello lineare di effetti misti con quattro punti temporali come fattori fissi e intercettazioni casuali per cinos, abbiamo concluso che le medie geometriche delle percentuali di pDC per tutte le scimmie erano uguali sui 4 punti temporali predosi (Figura 53, valore p per tempo basato su un test F: 0,67). Questa analisi ha indicato che la media geometrica della percentuale di PDC circolanti era relativamente stabile nel tempo per le macachi cinomolghi.

Nove di questi dodici macachi cinomolghi sono stati divisi in 3 gruppi (3/gruppo) e randomizzati per includere la rappresentazione uguale della densità BDCA2 e percentuale pDC in ciascun gruppo. I macachi cinomolghi

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.J. n° USBM-041R

hanno ricevuto una singola iniezione endovenosa di entrambi i veicoli (citrato di sodio), 10 mg/kg di BII059 o 1 mg/kg di BII059. La citometria a flusso è stata utilizzata per identificare le pDC circolanti nel sangue intero come CD20-CD14-CD123 + HLA-DR +, e la frequenza di pDC (su scala logaritmica) in ciascun punto temporale è stata rappresentata graficamente nel software R (Figura 54). È stato montato un modello lineare a effetti misti per registrare le frequenze (pDC) usando intercettazioni casuali per macachi cinomolghi ed effetti fissi per gruppo di dose e periodo di tempo: 1 ora, 6 ore, 1-27 giorni e più di 28 giorni. Per valutare se la pDC è cambiata tra i diversi gruppi di dosaggio in diversi periodi di tempo, un modello preliminare includeva anche i termini di interazione per gruppo di dosaggio e diversi periodi di tempo. Il valore p basato sul test F per testare tutti i termini di interazione pari a 0 è 0,81, il che indica che non vi è alcuna differenza per le variazioni di pDC tra i diversi gruppi di dose. Pertanto, il modello adattato finale includeva solo gli effetti statisticamente significativi per il periodo di tempo e i fattori del gruppo dose (Tabella 4).

Tabella 4. Stime del modello adattato per punti temporali dopo una singola iniezione di BII059 endovenosa o del veicolo

Stime per gli effetti fissi usando un modello lineare di effetti misti usando intercettazioni casuali per scimmie cynomolgus e fattori fissi per gruppo di dosaggio e livelli di tempo 1 ora, 6 ore e più di 28 giorni, per percentuale di pDC circolante su scala logaritmica prima e dopo IV dose di veicolo citrato di sodio, BII059 1 mg/kg o BII059 a 10 mg/kg nei macachi cinomolghi.				
	effetto	esp (stima dell'effetto)	95% CI	P
	est.	(rapporto% pDC)		

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Stime per gli effetti fissi usando un modello lineare di effetti misti usando intercettazioni casuali per scimmie cynomolgus e fattori fissi per gruppo di dosaggio e livelli di tempo 1 ora, 6 ore e più di 28 giorni, per percentuale di pDC circolante su scala logaritmica prima e dopo IV dose di veicolo citrato di sodio, BIIB059 1 mg/kg o BIIB059 a 10 mg/kg nei macachi cinomolghi.

	effetto est.	esp (stima dell'effetto) (rapporto% pDC)	95% CI	P
tempo: 1 ora rispetto ad altri	-0,56	0,57	Da 0,43 a 0,77	0,0003
tempo: 6 ore rispetto ad altri	0,46	1,58	Da 1,18 a 2,13	0,003
tempo: > 28 giorni rispetto ad altri	-0,48	0,62	da 0,55 a 0,70	<0,0001
Gruppo: BIIB059 1mg/kg rispetto al veicolo	0,49	1,64	da 1,20 a 2,25	0,01
Gruppo: BIIB059 10mg/kg rispetto al veicolo	0,09	1,09	da 0,79 a 1,50	0,84

Le stime dei parametri per i fattori fissi sono state esponenziate al fine di interpretarle come rapporti delle frequenze di pDC in questi periodi di tempo rispetto al dosaggio pre-BIIB059. Nel complesso, il rapporto era significativamente inferiore a uno quando si confrontavano le frequenze di pDC a 1 ora dopo l'iniezione endovenosa con frequenze di pDC pre-dose (IC al 95%:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. J. n° USBM-041R

0,43-0,77, valore p: 0,0003). Il rapporto era significativamente superiore a uno quando si confrontavano le frequenze di pDC a 6 ore dopo l'iniezione IV con frequenze di pDC pre-dose (IC al 95%: 1,18-2,12, valore p: 0,003). Il rapporto non era significativamente diverso da uno quando si confrontavano le frequenze di pDC a 1-28 giorni dopo l'iniezione IV con frequenze di pDC pre-dose. Il rapporto era significativamente inferiore a uno quando si confrontavano le frequenze di pDC a 28 giorni dopo l'iniezione IV con frequenze di pDC pre-dose (IC al 95%: 0,55-0,70, valore p: <0,0001), Il modello adattato finale è stato tracciato nella Figura 55. I risultati hanno rivelato che vi era un significativo impoverimento *in vivo* delle PDC circolanti nei macachi cinomolghi a 1 ora, un aumento significativo delle PDC circolanti a 6 ore e un significativo impoverimento delle PDC circolanti dopo 28 giorni dall'iniezione IV, ma cambiamenti nella percentuale di PDC attraverso il tempo era lo stesso per tutti i gruppi di trattamento.

Inoltre, dopo il completamento dei punti temporali dello studio IV, tre di questi macachi cinomolghi (4, 6 e 12) hanno ricevuto una singola dose sottocutanea di BIIB059 a 0,2 mg/kg, per valutare l'effetto di una dose inferiore su frequenze pDC circolanti. La frequenza di pDC (su scala logaritmica) in ciascun punto temporale è stata rappresentata graficamente nel software R (Figura 56). È stato inserito un modello lineare a effetti misti, che utilizzava tempo e ora continui a 1 ora come fattori fissi e macachi cinomolghi come intercettazioni casuali. I risultati sono mostrati in Tabella 5.

Tabella 5. Stime del modello adattato per punti temporali dopo una singola iniezione di BIIB059 sottocutanea

Ing.  Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R


Stime per gli effetti fissi usando un modello lineare di effetti misti usando tempo e tempo continui a 1 ora come fattori fissi e macachi cinomolghi come intercettazioni casuali per percentuale di pDC circolante su scala logaritmica, prima e dopo una singola iniezione sottocutanea di BIIB059 0,2 mg/kg nei macachi cinomolghi

	effetto est.	esp (stima dell'effetto) (rapporto% pDC)	95% IC	P
tempo (continuo)	0,01	1,01	da 1,00 a 1,02	<0,0001
tempo: 1 ora rispetto ad altri	-0,78	0,46	da 0,34 a 0,65	<0,0001

5 Simile ai risultati precedenti, abbiamo osservato una significativa deplezione in vivo delle pDC circolanti dei macachi cinomolghi a 1 ora dopo iniezioni IV (IC al 95%: 0,34-0,55, valore p <0,0001), ma la media geometrica di% pDC per i tre macachi cinomolghi è aumentata costantemente con l'aumentare del tempo (IC al 95%: 1.00-1.03 numero di volte al giorno, valore p <0,0001). Il modello adattato è stato tracciato nella Figura 57.

10 In conclusione, questi dati mostrano che BIIB059 non media una deplezione sostenuta di pDC nel sangue dei macachi cinomolghi quando somministrato alle dosi testate. Ciò è probabilmente dovuto all'internalizzazione di BDCA2.

Esempio 49: La somministrazione di BIIB059 ai macachi cinomolghi provoca l'inibizione della produzione di IFN α indotta da TLR9 nel saggio del sangue intero Ex Vivo



Ing. Giacomo Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

L'obiettivo di questo studio era determinare se BIIB059, quando somministrato ai macachi cinomolghi *in vivo*, potesse alterare la produzione di IFN α in risposta alla stimolazione TLR9 in un saggio del sangue intero *ex vivo* (WBA).

5 Le vie di somministrazione endovenosa e sottocutanea sono state valutate per la loro capacità di influenzare l'induzione dell'IFN α , che è stata misurata utilizzando il saggio biologico MxA secondo il piano sperimentale illustrato nella Figura 58. Il ligando TLR9 (CpG-A) ha indotto quantità misurabili di IFN α in colture di sangue intero in tutti i punti temporali e in tutti i macachi
10 cinomolghi, mentre non è stato rilevato IFN α nelle colture trattate con PBS di controllo (dati non mostrati).

Per i macachi cinomolghi che hanno ricevuto somministrazione per via endovenosa, i valori di IFN α post-trattamento sono stati calcolati come percentuali della media pre-dose per ciascun animale. I dati relativi alle
15 emorragie dopo il giorno 14 sono stati esclusi dall'analisi poiché il saggio del sangue intero non è stato eseguito per il gruppo BIIB059 da 10 mg/kg dopo questo periodo di tempo. È stata osservata una tendenza alla riduzione dell'IFN α % rispetto alla media pre-dose in diversi giorni dopo la somministrazione del farmaco nei gruppi di dosaggio BIIB059 da 1 mg/kg e 10
20 mg/kg rispetto al gruppo del veicolo (Figura 59)

È stata eseguita un'analisi più completa dei dati utilizzando l'analisi degli effetti misti bidirezionali della varianza (ANOVA) per stimare l'IFN α medio e le differenze post versus pre per ogni gruppo di dosaggio nello studio IV. I dati durante le prime 24 ore successive alla somministrazione sono stati esclusi a
25 causa di una riduzione osservata delle percentuali di cellule dendritiche


Ing. Francesco Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

plasmacitoidi del sangue periferico. I dati per sanguinamenti dopo il giorno 31 post-dose sono stati esclusi dall'analisi a causa del ritorno dell'espressione di BDCA2 osservata in questo momento. Per il gruppo dosato dal veicolo, la media geometrica IFN α era 362 Unità/mL (U/mL) pre-dose e 314 U/mL post-dose; per il gruppo trattato con 1 mg/kg, la media geometrica era 399 U/mL pre-dose e 237 U/mL post-dose; per il gruppo 10 mg/kg, la media geometrica IFN α era 211 U/mL pre-dose e 102 U/mL post-dose (Figura 4). Le differenze post-pre nel log₁₀ IFN α medio erano -0,061 (p = 0,511) per il gruppo Veicolo, -0,226 (p = 0,016) per il gruppo 1 mg/kg e -0,317 (p = 0,004) per il 10 mg/kg di gruppo. Dopo la trasformazione anti-log₁₀, questi risultati hanno rivelato che il gruppo Veicolo aveva $10^{-0,061} = 87\%$ (IC 95%: 57% -133%) della concentrazione di IFN α post-dose rispetto alla pre-dose; il gruppo 1 mg/kg aveva $10^{-0,226} = 59\%$ (IC 95%: 39% -91%) della concentrazione di IFN post-dose rispetto alla pre-dose; e il gruppo 10 mg/kg aveva $10^{-0,317} = 48\%$ (IC 95%: 29% -79%) della concentrazione di IFN post-dose rispetto alla pre-dose (Figura 60).

Per la coorte di macachi cinomolghi dosati per via sottocutanea, è stata utilizzata un'analisi unidirezionale della varianza (ANOVA) con effetti casuali per stimare l'IFN α media e le differenze post versus pre per l'intero gruppo. I dati durante le prime 24 ore successive alla somministrazione sono stati esclusi a causa di una riduzione osservata delle percentuali di cellule dendritiche plasmacitoidi del sangue periferico. I dati per sanguinamenti dopo il giorno 33 post-dose sono stati esclusi dall'analisi a causa del recupero dell'espressione di BDCA2 osservata in questo momento. Per il gruppo somministrato per via sottocutanea, la media geometrica IFN α era 1243 U/mL pre-dose e 812 U/mL post-dose, con un rapporto post/pre del 65%. La differenza post-pre nel log

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

medio 10 è stata stimata essere -0,185 ($p = 0,059$) che, dopo trasformazione anti-log10, corrisponde a $10^{-0,185} = 65\%$ della media geometrica pre-dose; l'IC al 95% di questo effetto è del 41% -102% (Figura 61).

Dato che solo un piccolo numero di macachi cinomolghi sono state
5 utilizzate nell'esperimento, la concentrazione di IFN α determinata per ogni scimmia influenza fortemente i risultati per quel gruppo. La percentuale di variazione dovuta alle differenze animali nello studio endovenoso era del 69% della variabilità totale, il resto era principalmente dovuto alle differenze tra i punti temporali all'interno del macaco cinomolgo (26%) e una piccola quantità
10 (<6%) dovuta a testare le fonti di variazione. La variazione tra i macachi cinomolghi è molto più grande della variazione tra i punti temporali all'interno delle scimmie cynomolgus, suggerendo che l'aggiunta di macachi cinomolghi a questo esperimento rispetto a punti temporali più sanguinanti alimenterebbe meglio lo studio. La percentuale di variazione dovuta alle differenze del macaco
15 cinomolgo nello studio sottocutaneo era del 45% della variabilità totale, con il resto dovuto principalmente alle differenze tra i punti temporali all'interno del macaco cinomolgo e una quantità trascurabile (<2%) a causa delle fonti di analisi variazione.

La variabilità osservata tra i macachi cinomolghi e all'interno dei macachi
20 cinomolghi può essere dovuta a una serie di fattori, tra cui fluttuazioni delle condizioni fisiologiche dei macachi cinomolghi, composizione cellulare del sangue, composizione molecolare della cellula e precisione del test funzionale.

Sebbene nel tempo si sia verificata una certa fluttuazione delle percentuali di cellule dendritiche plasmacitoidi in ciascun animale, la
25 percentuale di pDC nel sangue non è stata influenzata dal trattamento con


Ing. Lnes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

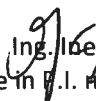
BII059 (vedi Rsch-2013-046) e non ha mostrato una correlazione coerente con la produzione di IFN α . Inoltre, è stata osservata una perdita rapida e sostenuta di BDCA2 dalla superficie cellulare su pDC dopo somministrazione di IV e SC BII059, suggerendo un alto livello di occupazione dei recettori (vedere
5 Rsch-2013-043). Tenendo conto dell'elevato livello di variabilità nella reattività di pDC dai macachi cinomolghi alla stimolazione TLR9, vi è stata una tendenza verso risposte smorzate dell'IFN α a seguito di somministrazione endovenosa e sottocutanea di BII059, con la più grande riduzione nel gruppo con dosaggio IV di 10 mg/kg, seguito dal gruppo SC 0,2 mg/kg e quindi il gruppo IV da 1
10 mg/kg.

In conclusione, BII059 quando somministrato *in vivo* a macachi cinomolghi, ha mostrato una tendenza verso la produzione inibita di IFN indotta da TLR9 in un WBA *ex vivo*.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo isolato che lega l'antigene 2 delle cellule dendritiche del sangue umano (BDCA2) (SEQ ID NO: 1), in cui l'anticorpo comprende un dominio variabile pesante (VH) identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e in cui l'anticorpo comprende un dominio variabile leggero (VL) identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23.
2. L'anticorpo della rivendicazione 1, in cui l'anticorpo una catena pesante e una catena leggera e in cui la catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4 e in cui la catena leggera comprende la sequenza di SEQ ID NO:3.
3. L'anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo è un anticorpo che ha una regione costante di catena pesante IgG1.
4. Frammento legante l'antigene isolato che lega l'antigene 2 delle cellule dendritiche del sangue umano (BDCA2) (SEQ ID NO: 1), in cui il frammento legante l'antigene comprende un dominio variabile pesante (VH) identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e in cui il frammento legante l'antigene comprende un dominio variabile leggero (VL) identico alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23.
5. Il frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 4, in cui il frammento legante l'antigene è:
 - (a) un anticorpo a catena singola;
 - (b) un frammento Fab;
 - (c) un frammento F(ab')₂;
 - (d) un frammento Fab';
 - (e) un frammento Fsc;

- (f) un frammento Fv;
 - (g) una scFv;
 - (h) una sc (Fv) 2; o
 - (i) un diabody.
6. Cellula isolata che produce l'anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 o che produce il frammento legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 5.
7. Composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 o il frammento legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 5 e un veicolo farmaceuticamente accettabile.
8. L'anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 o il frammento legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 5 per l'uso in un metodo di trattamento di un disturbo infiammatorio o una patologia autoimmune in un soggetto umano che ne ha bisogno.
9. L'anticorpo o il frammento legante l'antigene per l'uso secondo la rivendicazione 8 in cui:
- (a) il disturbo infiammatorio è selezionato dal gruppo costituito da lupus eritematoso sistemico, lupus discoide, nefrite lupica, lupus cutaneo, artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale, sclerosi sistemica (sclerodermia), psoriasi, diabete di tipo I, dermatomiosite e polimiosi;
 - (b) il disturbo infiammatorio è da lupus moderato a grave con sistema nervoso centrale attivo (SNC) e/o coinvolgimento renale; o
 - (c) il disturbo infiammatorio è da lupus moderato a grave senza sistema nervoso centrale attivo (SNC) e/o coinvolgimento renale.
10. L'anticorpo o il frammento legante l'antigene per l'uso secondo la


Ing. Ildes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

rivendicazione 8, in cui il disturbo infiammatorio è il lupus eritematoso sistemico (LES).

11. Metodo in vitro per la produzione dell'anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 o il frammento legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 5 in cui il metodo comprende:

- (a) costruzione di un polinucleotide che codifica l'anticorpo o il frammento legante l'antigene;
- (b) introdurre il polinucleotide in un vettore di espressione; e
- (c) esprimere il polinucleotide in una cellula ospite.

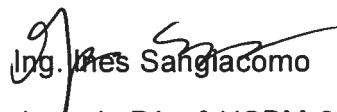
* * * * *

Seguono n° 63 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 08 Aprile 2020

In Fede,


Ing. Mes Sangiacomo

Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 1

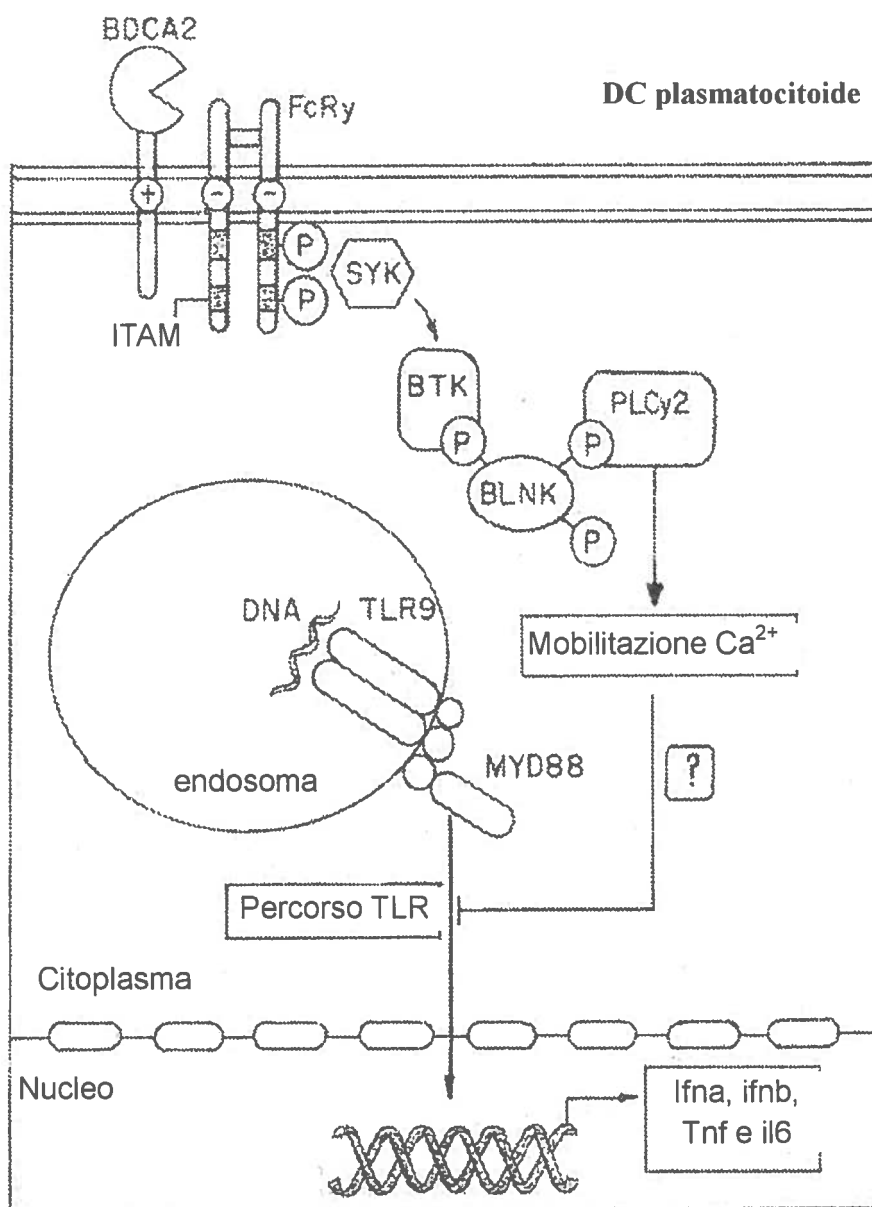
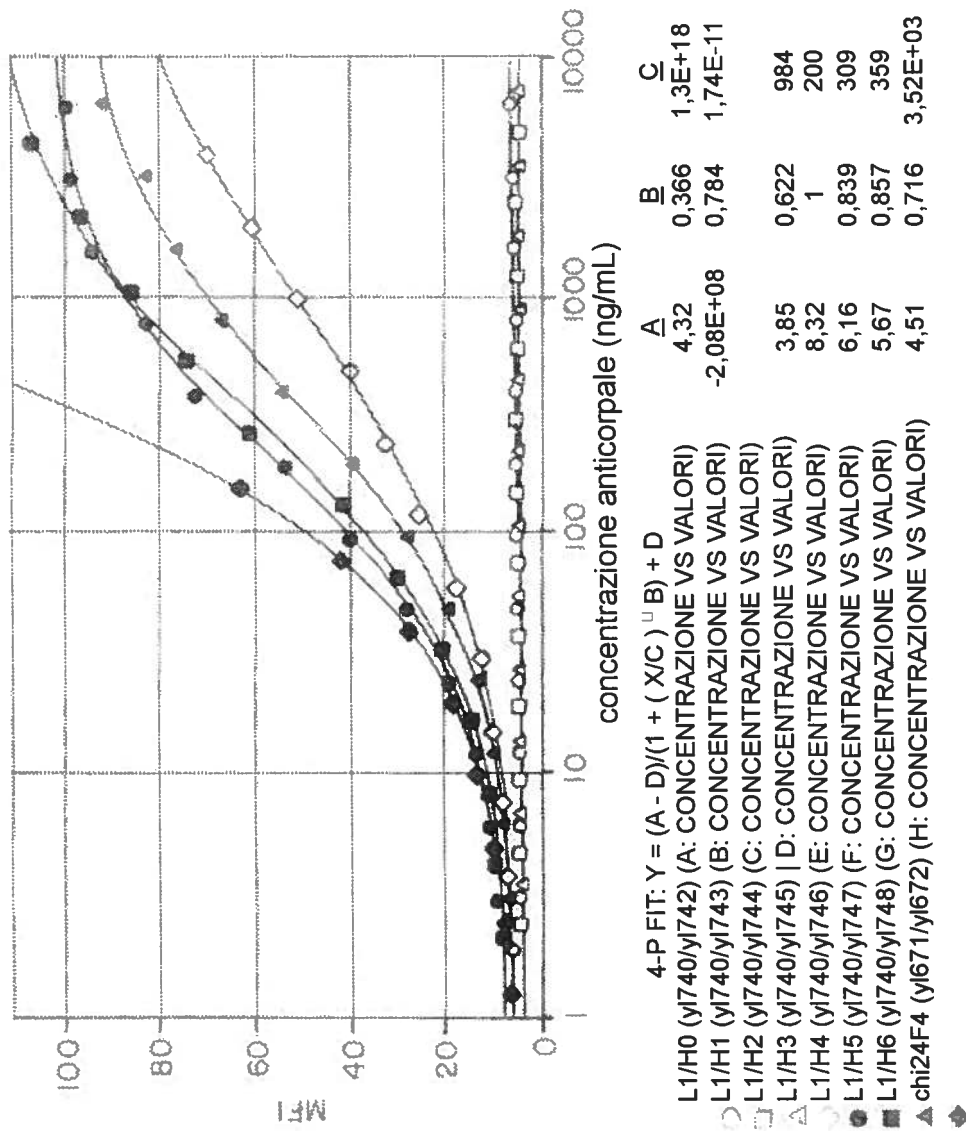


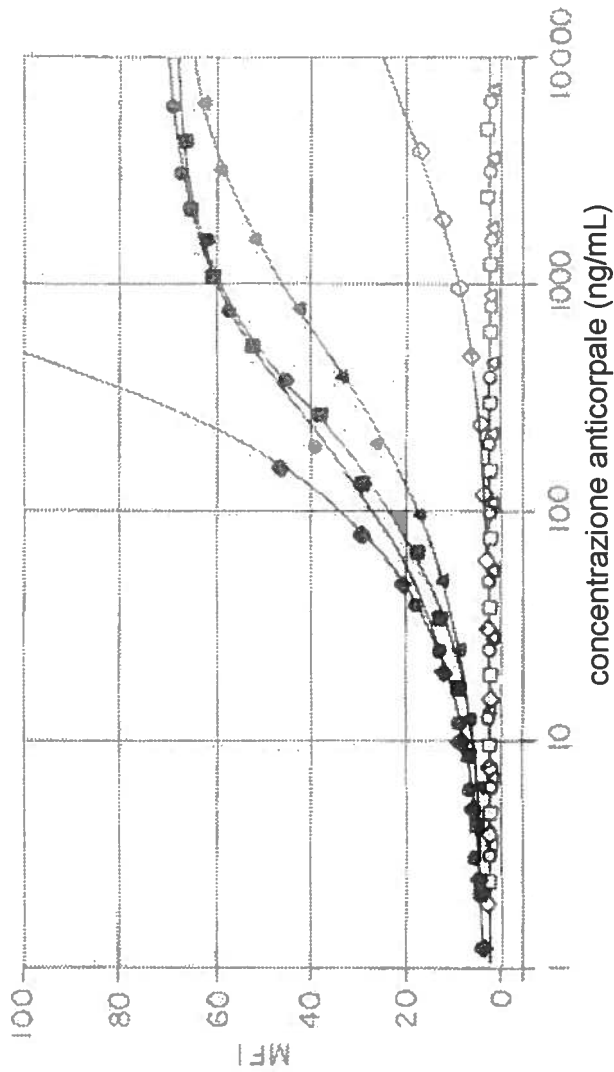
Fig. 1nes, Sangiacomo
Consulente in p.l. n° USBM-041R

FIG. 2



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P. n° USBM-041R

FIG. 3



4-P FIT: $Y = (A - D)/(1 + (X/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
L1/H0 (y1740/y1742) (A: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	1,57	0,901	1,65E+04	2,53	0,966
L1/H1 (y1740/y1743) (B: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	1,58	0,777	3,38E+10	1,62E+05	0,997
L1/H2 (y1740/y1744) (C: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	1,59	0,776	5,32E+04	3,33	0,989
L1/H3 (y1740/y1745) D: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	1,62	0,79	7,67E+03	41,8	1
L1/H4 (y1740/y1746) (E: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	3,13	0,874	210	71,9	0,998
L1/H5 (y1740/y1747) (F: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	4,01	1,09	228	68,9	0,998
L1/H6 (y1740/y1748) (G: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	2,43	0,789	501	70,7	0,999
chi24F4 (y1671/y1672) (H: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	2,08	0,737	2E+05	8,51E+03	1

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.R. n° USBM-041R

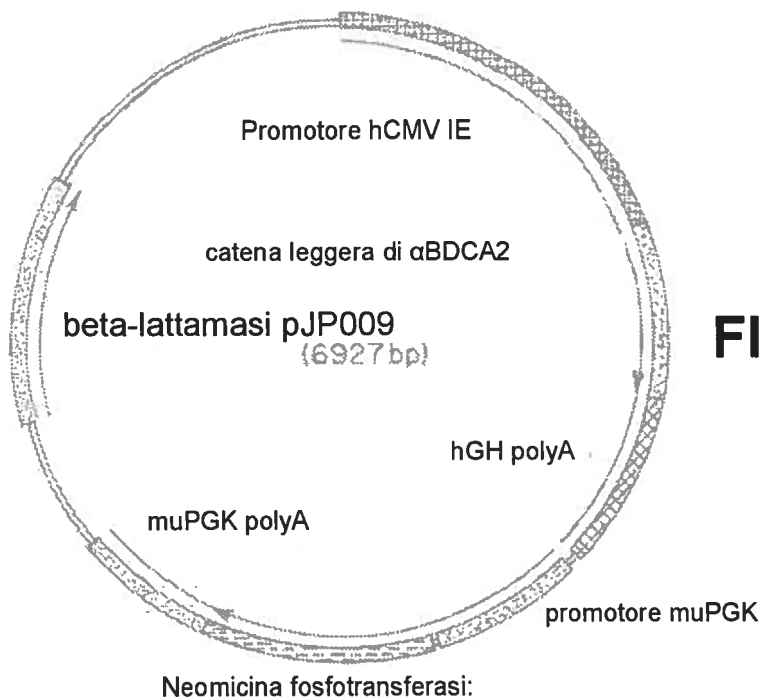


FIG. 4

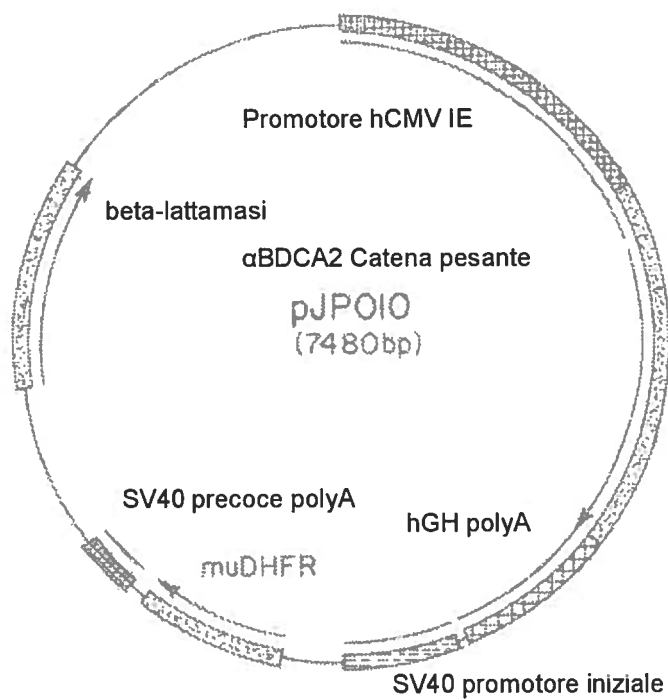


FIG. 5

FIG 6A

sangue intero cyno
BIIB059 EC50 = 0,9442 ug/mL

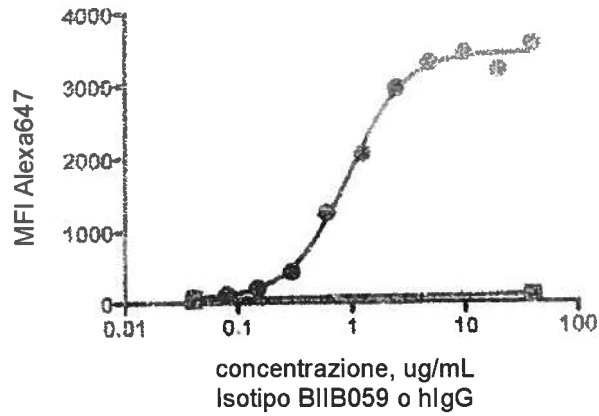
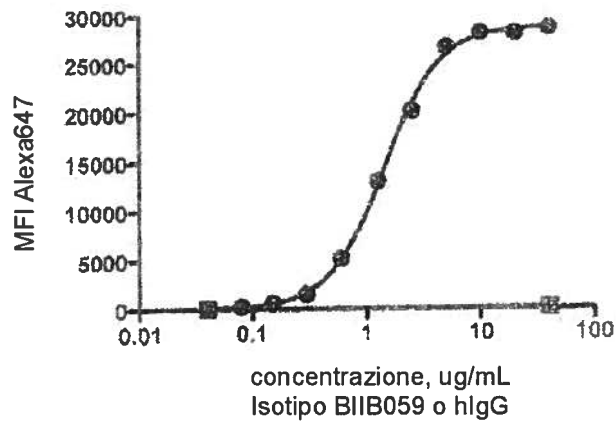


FIG 6B

Sangue intero umano
BIIB059 EC50 = 1,437 ug/mL



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 7

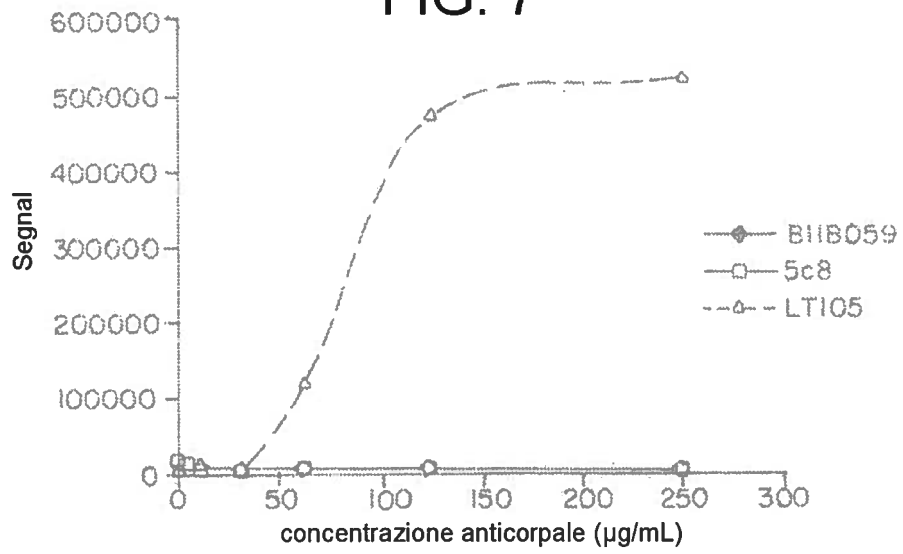
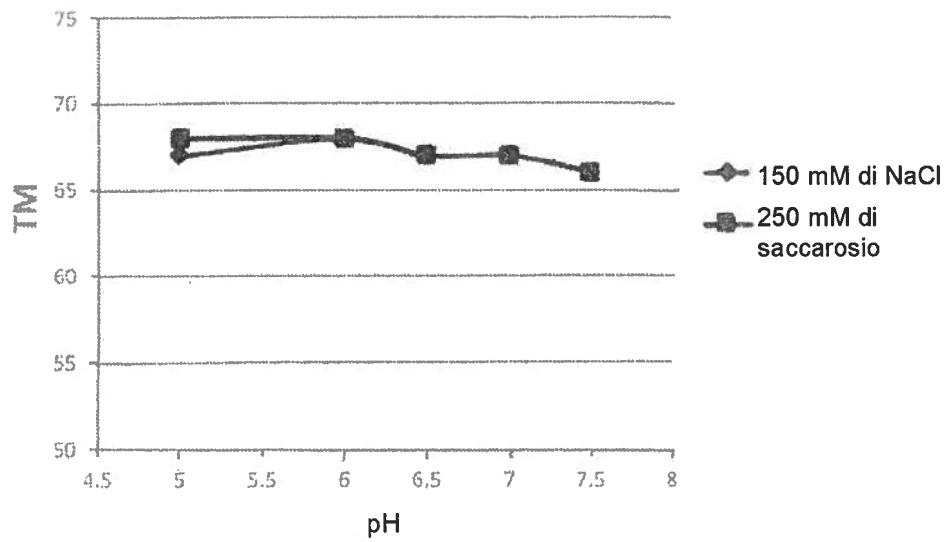
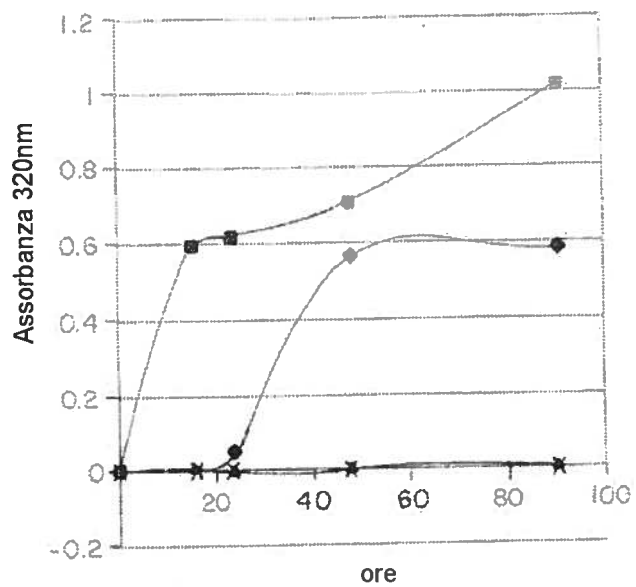


FIG. 8



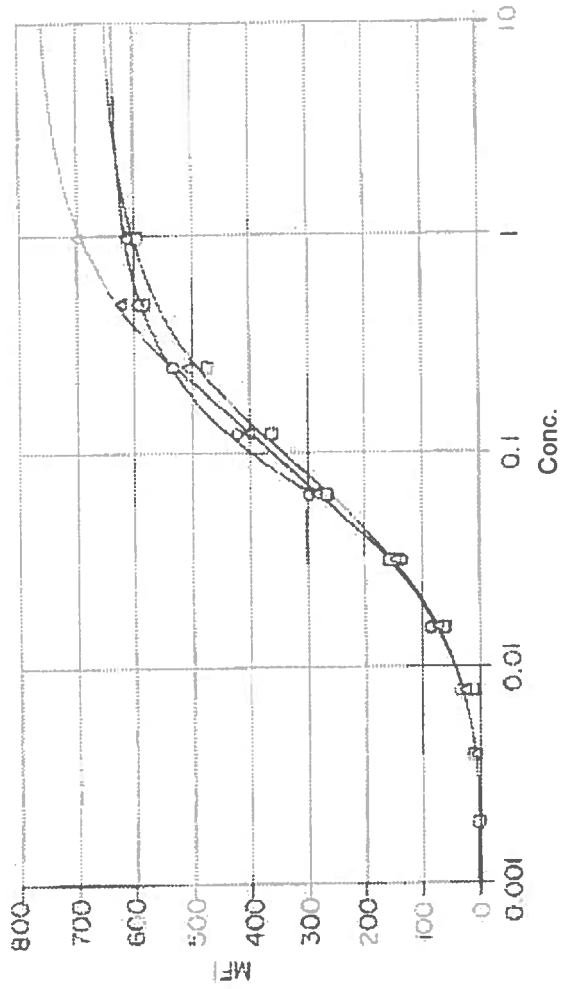
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

FIG. 9



- ◆— BIIB059 tipo selvaggio IgG1
- BIIB059 aglicosile IgG4/IgG1
- ▲— BIIB059 tipo selvaggio IgG1 + Tween80
- ×— BIIB059 aglicosile IgG4/IgG1 + Tween80

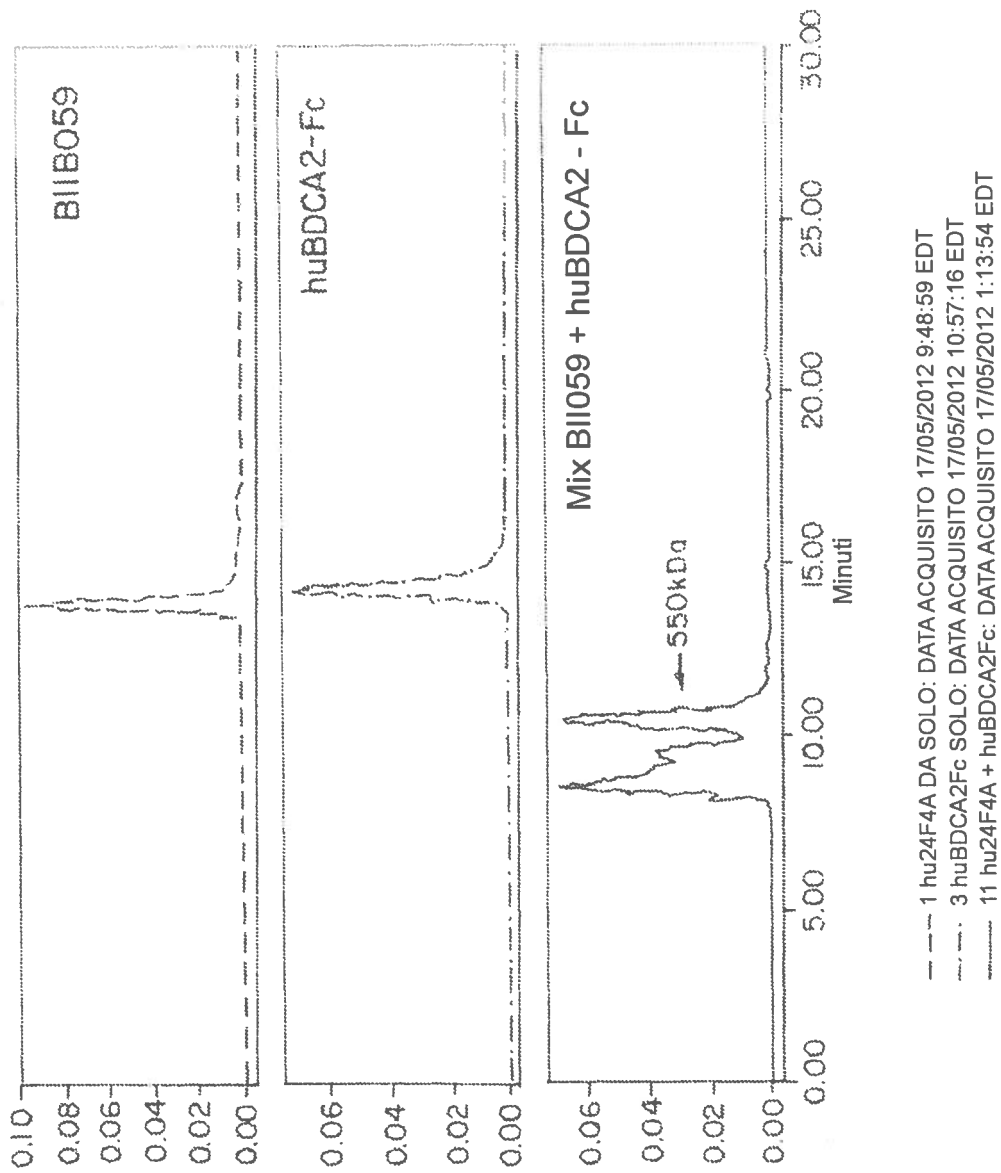
FIG. 10



* 4 - P FIT: $Y = (A - D)/(1 + (X/C)^B) + D$

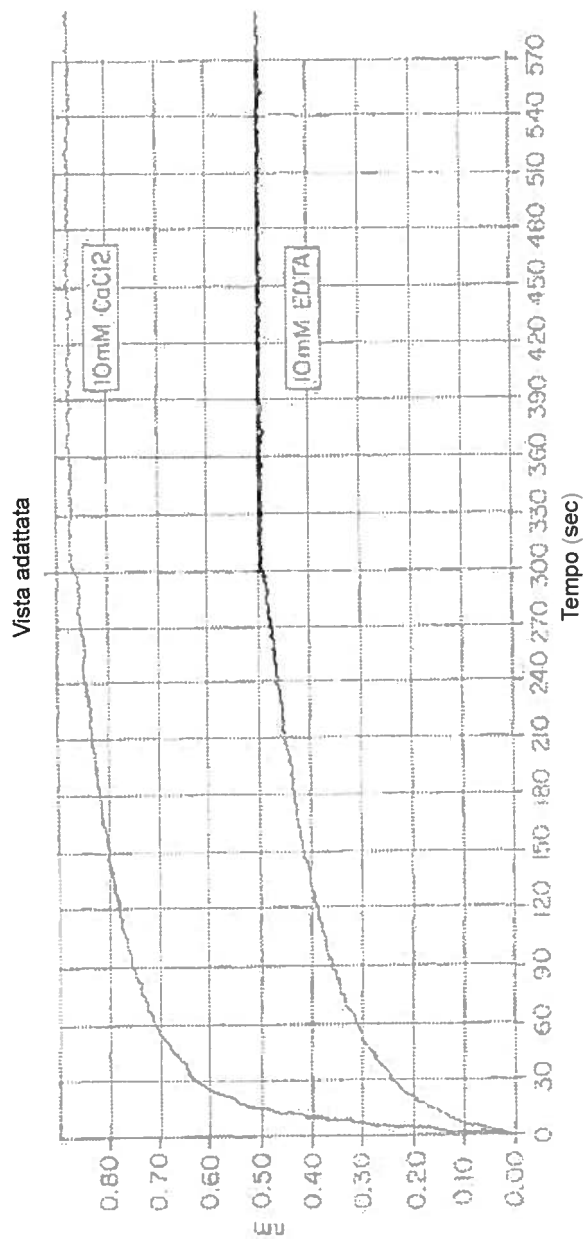
Ing. Ives Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 11



Ing. Inés Sangiacomo
Consulente in P. n. USBM-041R

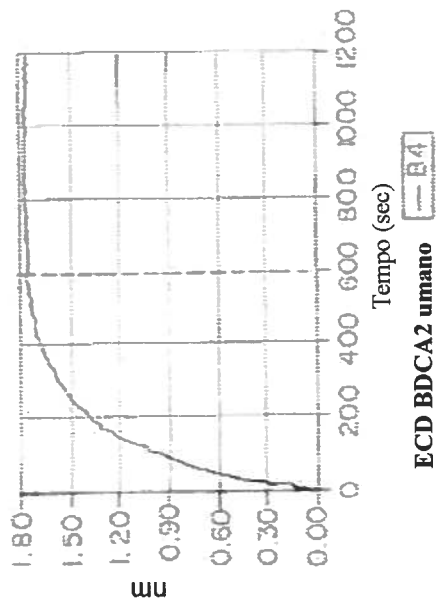
FIG. 12



Ing. Luis Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

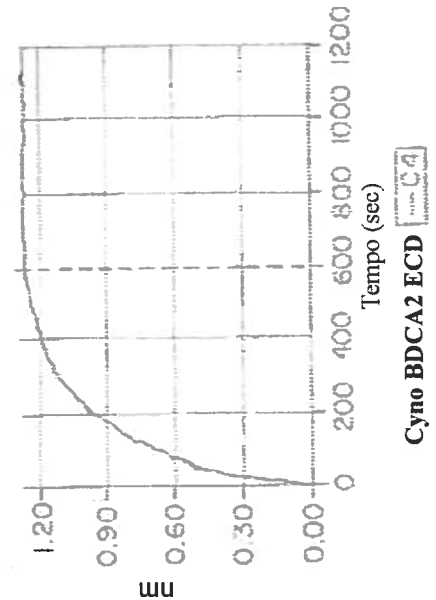
FIG. 13

Posizione del sensore: B12 - di Assoc. (campione)



ECD BDCA2 umano B4

Posizione del sensore: C12 - di Assoc. (campione)



Cyno BDCA2 ECD C4

Ing. nes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

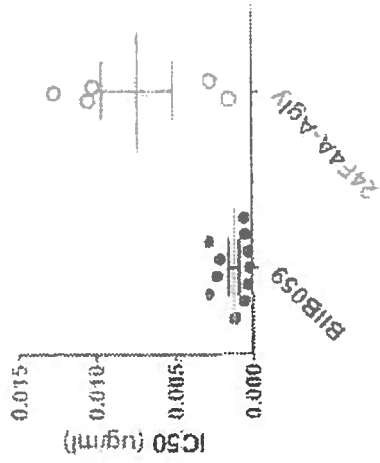
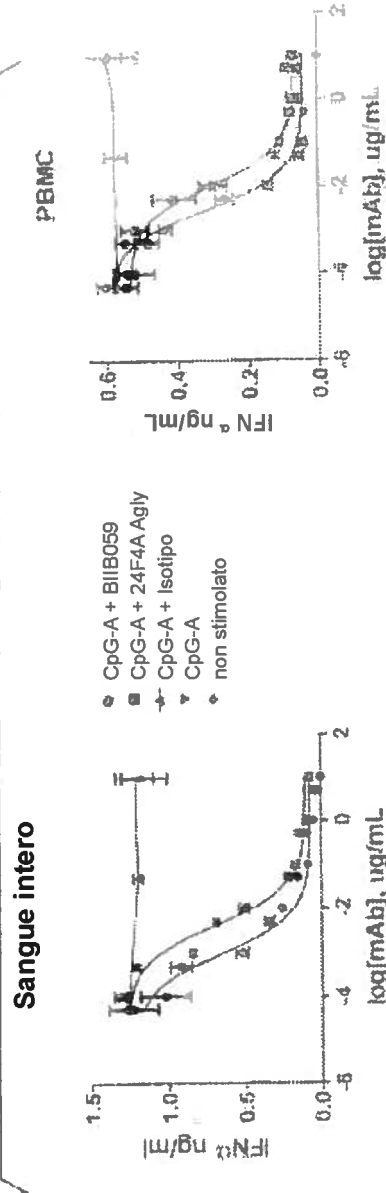


FIG. 14

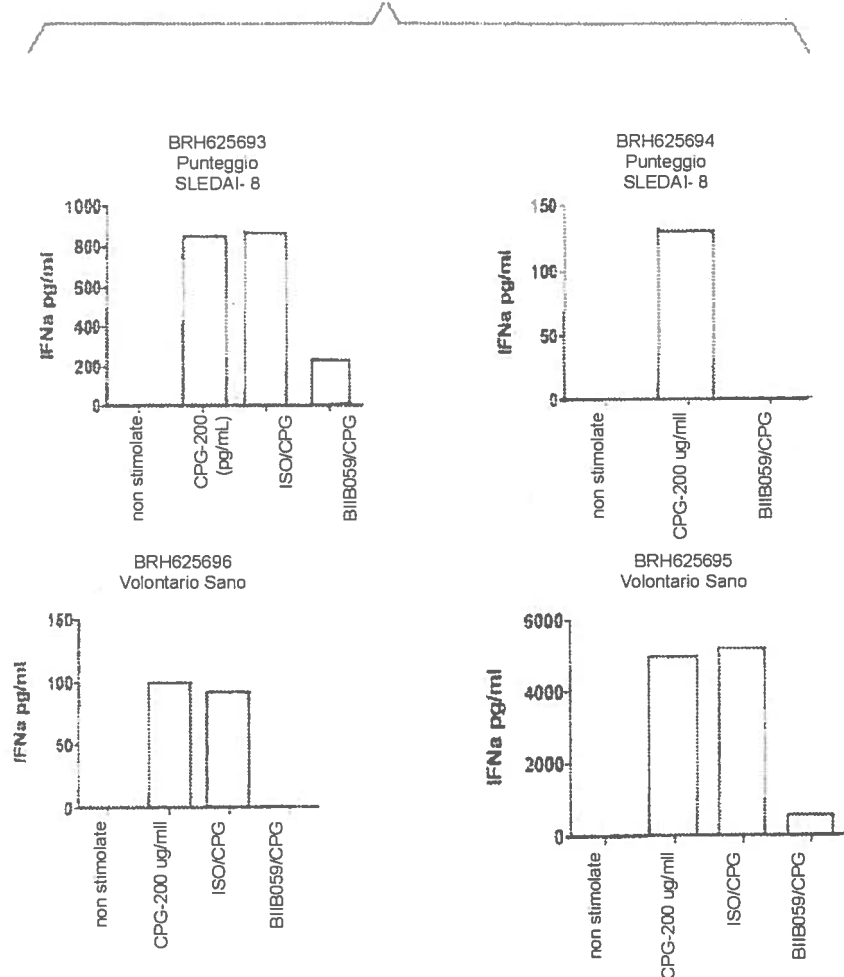
FIG 15A



Le linee verticali rappresentano il SEM

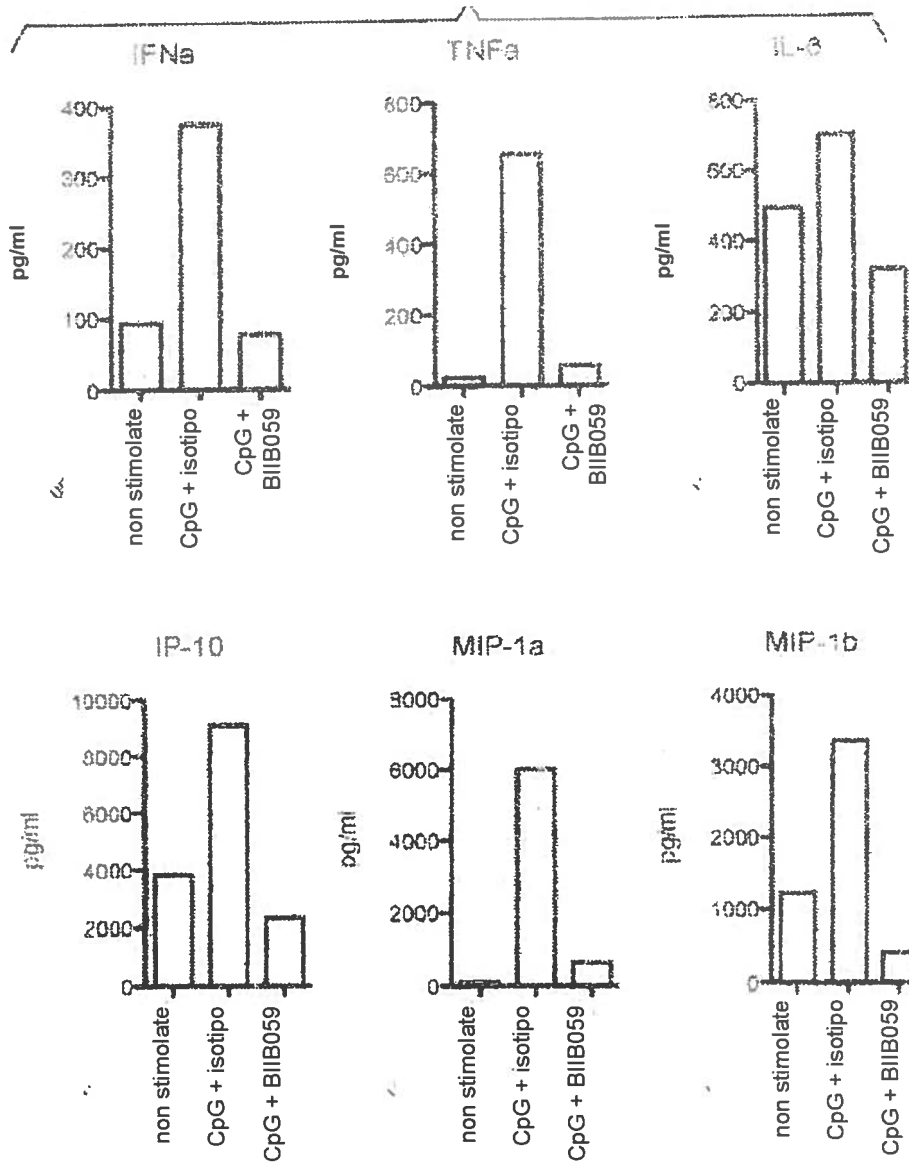
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 15B



Dr. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 15C



Ing. Francesco Sangiacomo
 Consulente in P. n.° 05BM-041R

FIG. 16

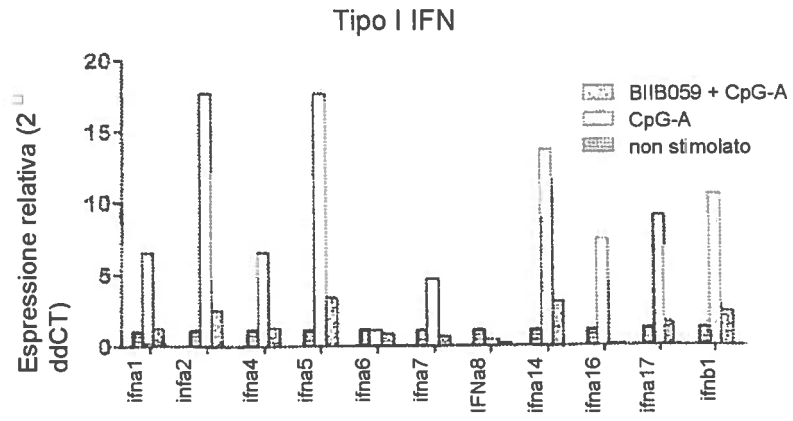
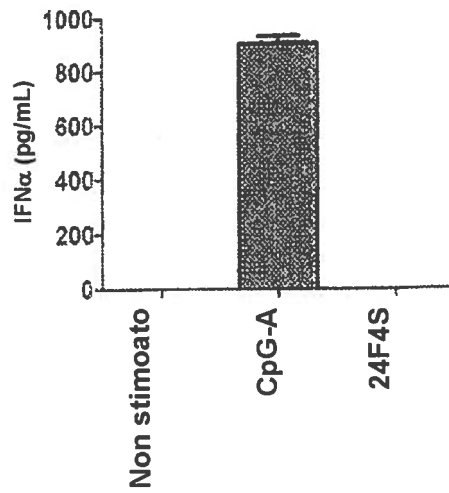
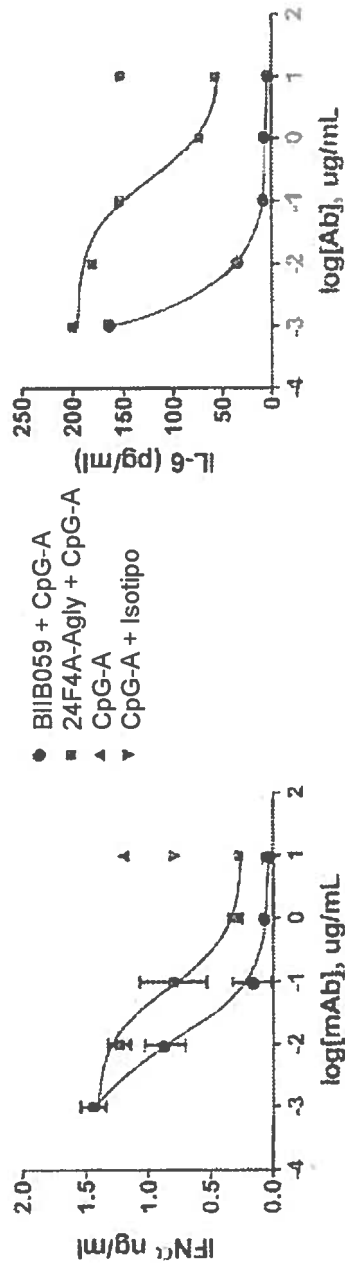


FIG. 18



Ing. nes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° OSBM-041R

FIG. 17



Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 19A

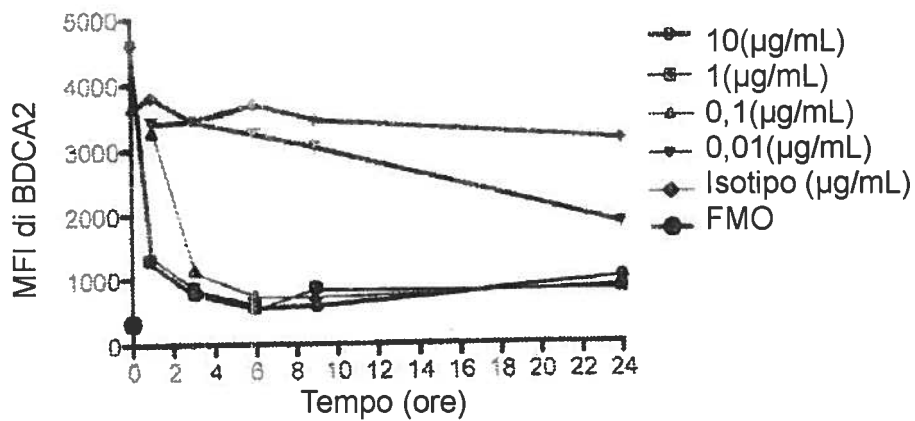
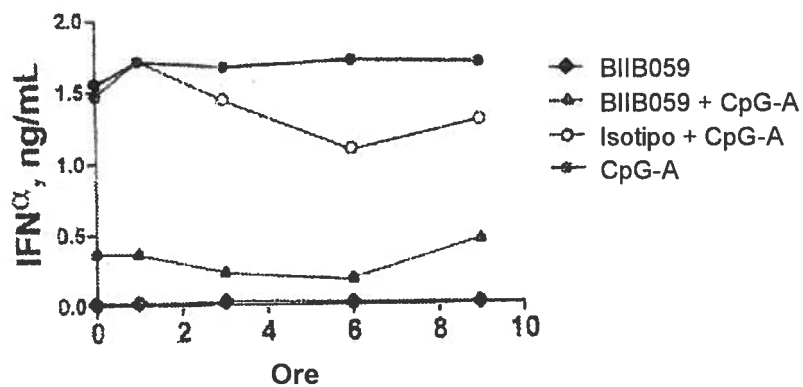
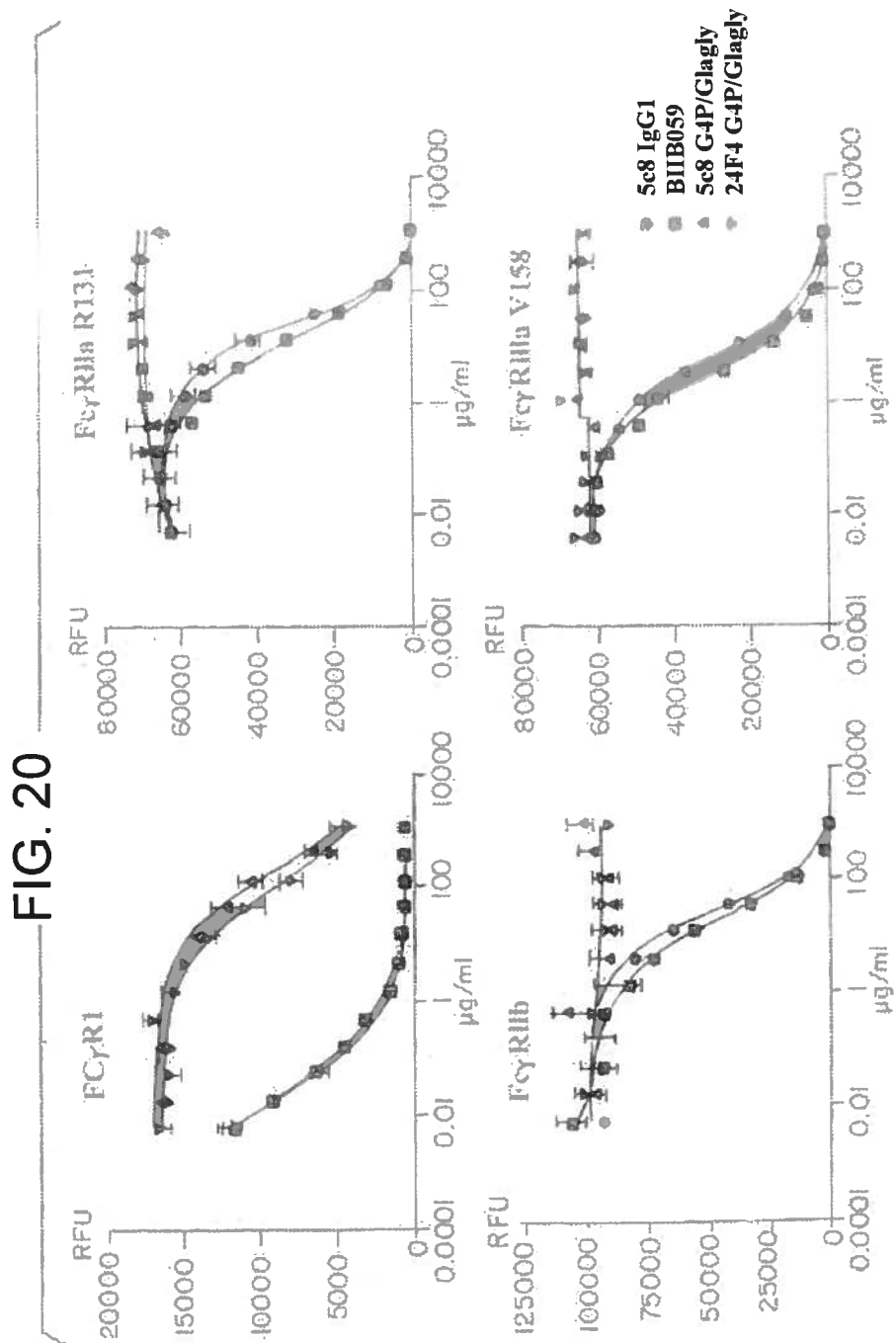


FIG 19B






 Ing. Zines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

C1qELISA BIIB059 e 24F4A G4.P/G1 agly (controlli 5c8)

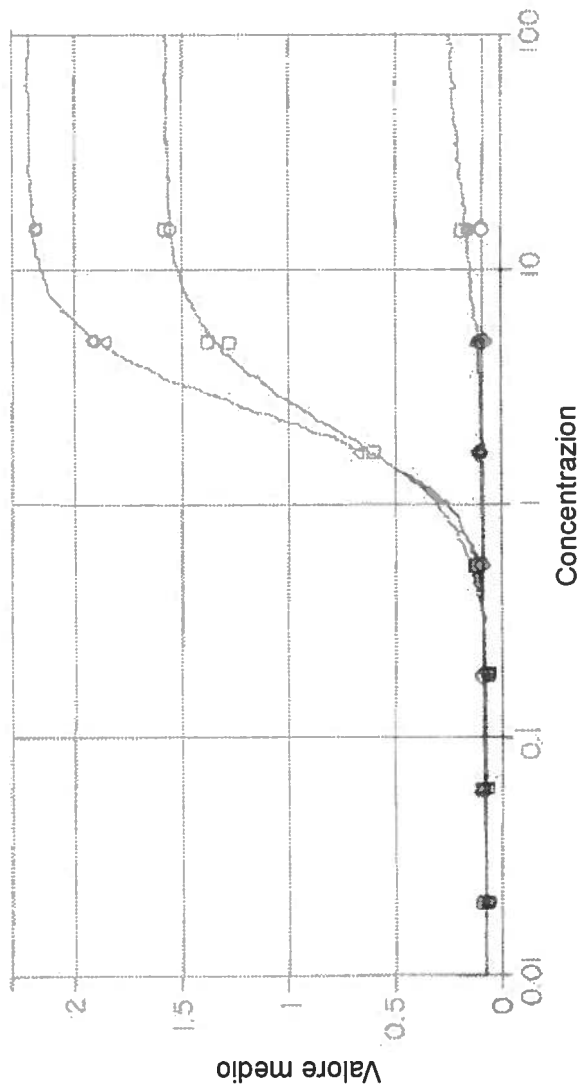


FIG. 21

	A	B	C	D	R ^{U2}
STD (STANDARD: CONCENTRAZIONE RISPETTO AL VALORE MEDIO)					
traccia n. 1 (5C8 G1 WT: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	0,06	2,093	2,215	1,573	0,997
Traccia n. 2 (BIIB059 G1 WT: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	0,061	2,527	2,502	2,212	1
Traccia n. 3 (5C8 G4.P/G1 AGLY: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	0,06	41,873	0,062	0,09	0,735
Traccia # 4 (24F4A G4.P/G1 AGLY: CONCENTRAZIONE VS VALORI)	0,067	0,974	17,136	0,277	0,9

NESSUN DATO DISPONIBILE

$$Y = ((A - D) / (1 + (X/C)^B)) + D$$

Ingeg. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 22A

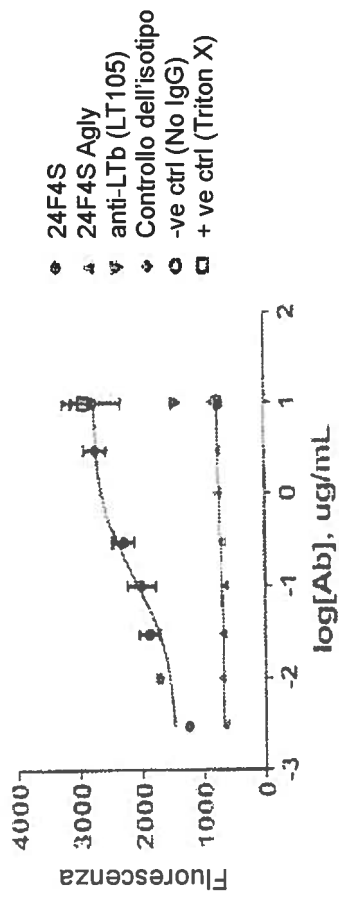
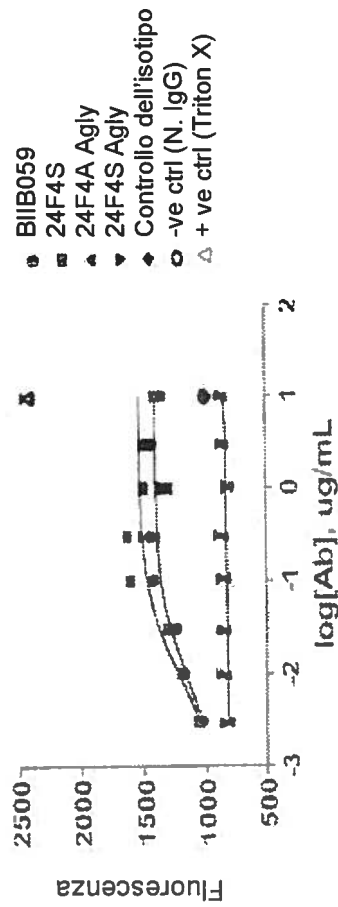
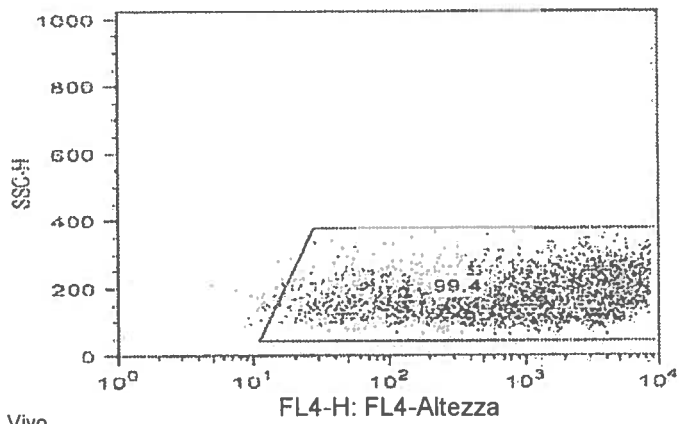


FIG 22B



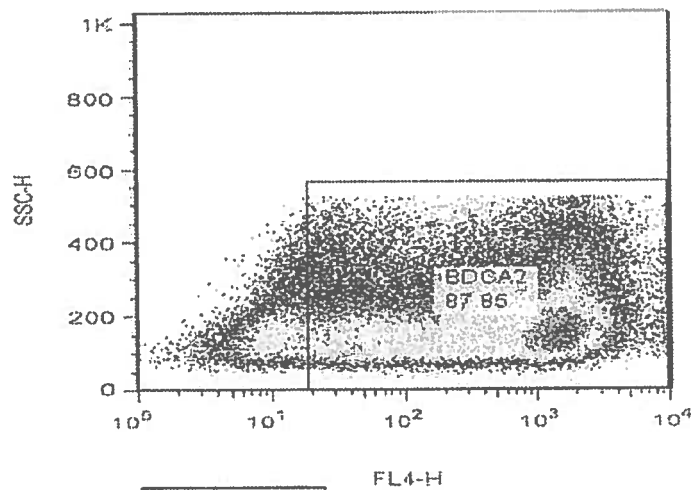
Ines Sangiacomo
 Consulente in P.R. n° USBM-041R

FIG 22C



Vivo
JBM1.083111.P1.C03
Conteggio eventi: 6030

FIG 22D



campione.003
Linfociti
83783

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 23

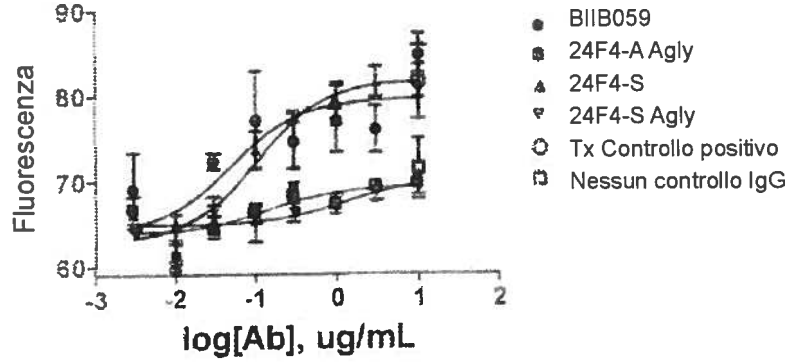


FIG. 32

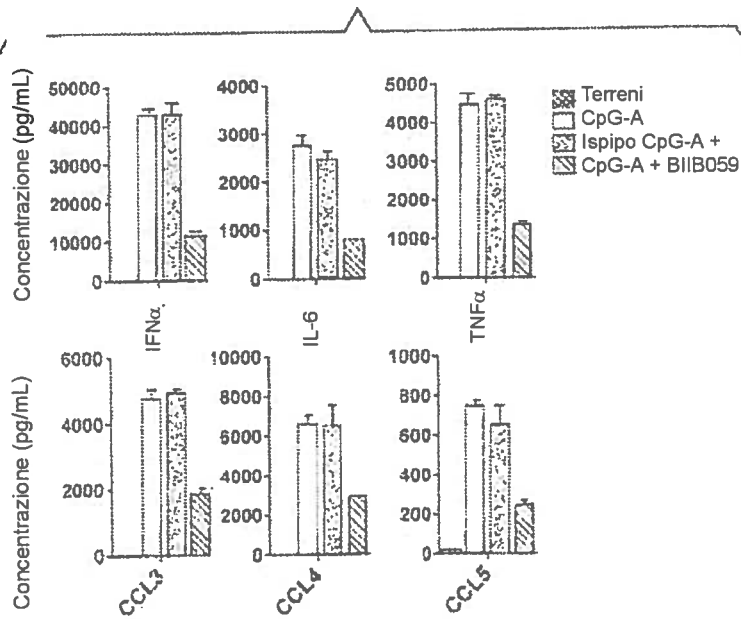
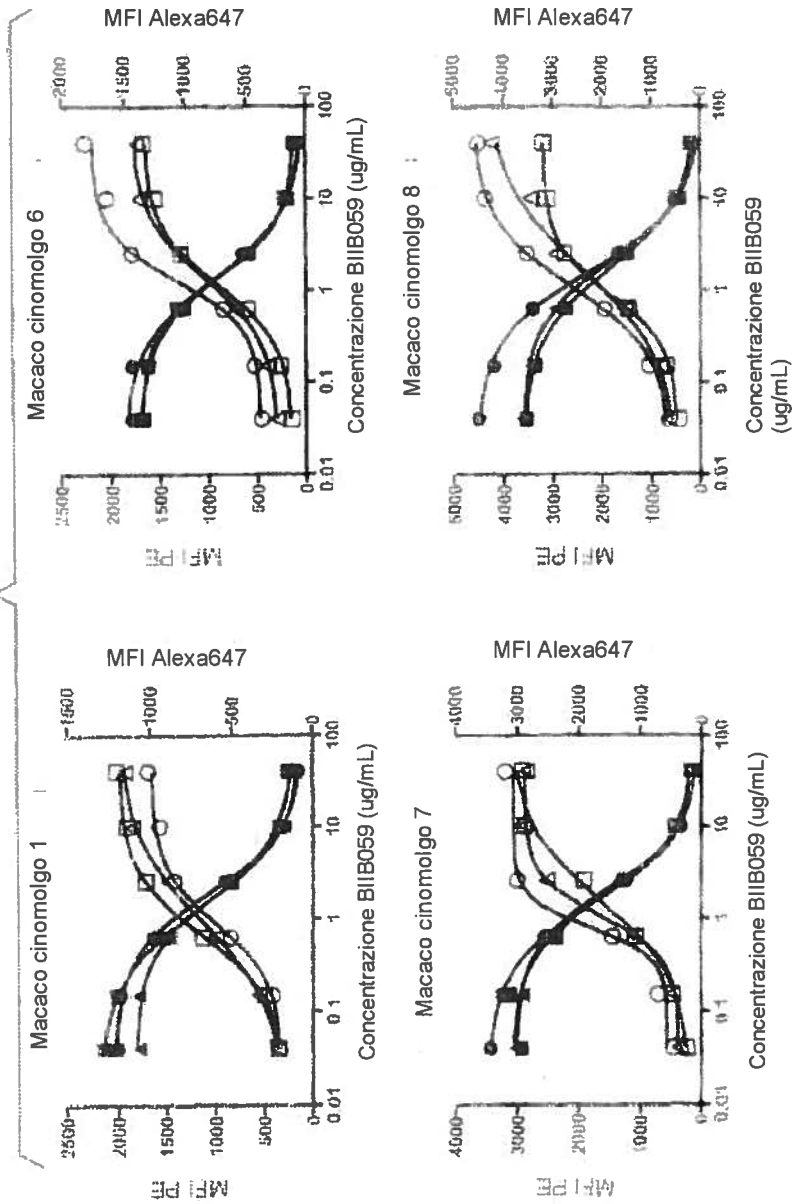


FIG. 24



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 25

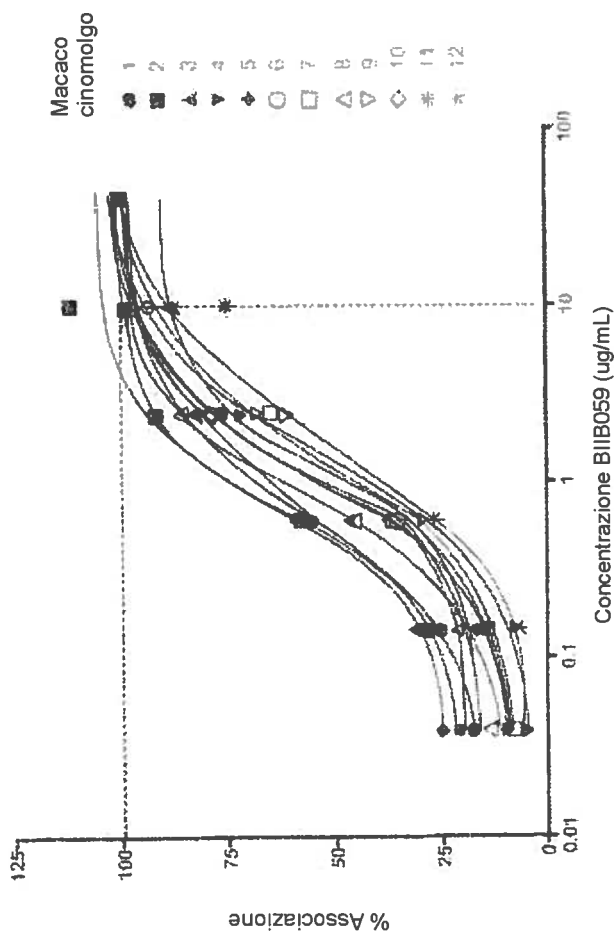
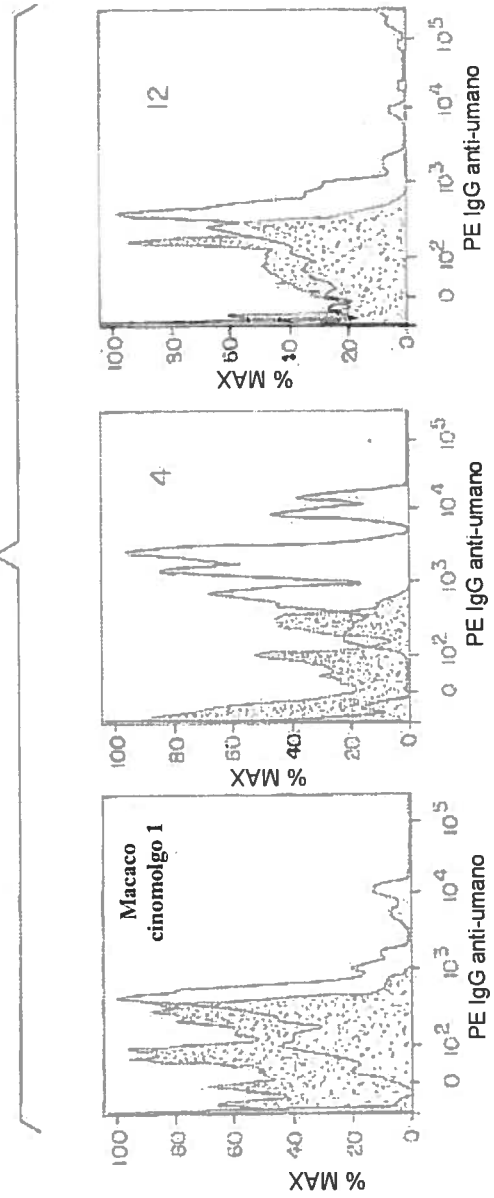


FIG 26A



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

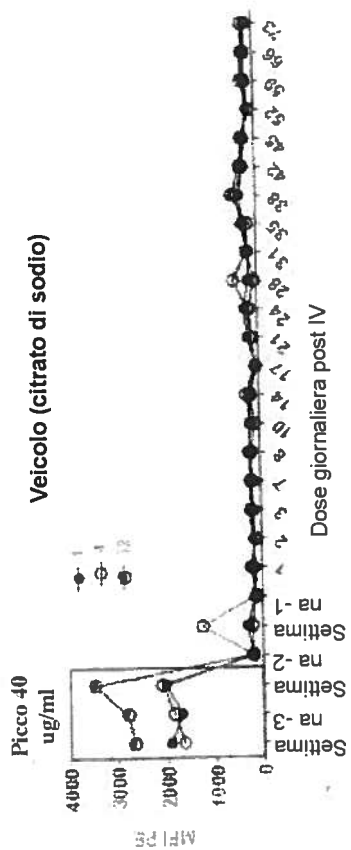


FIG 26B

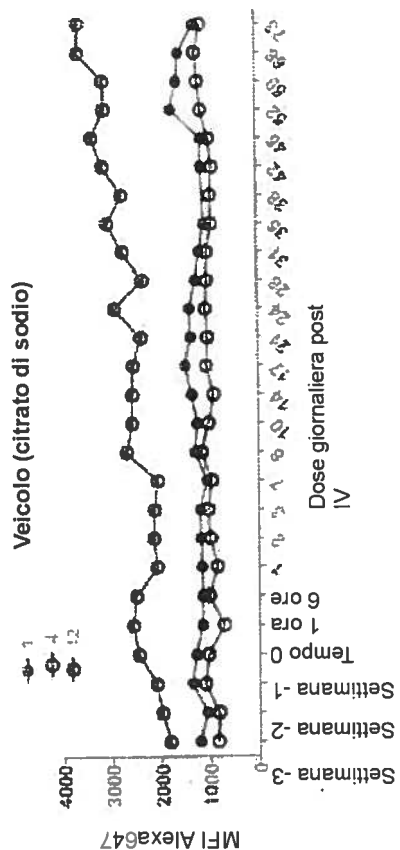
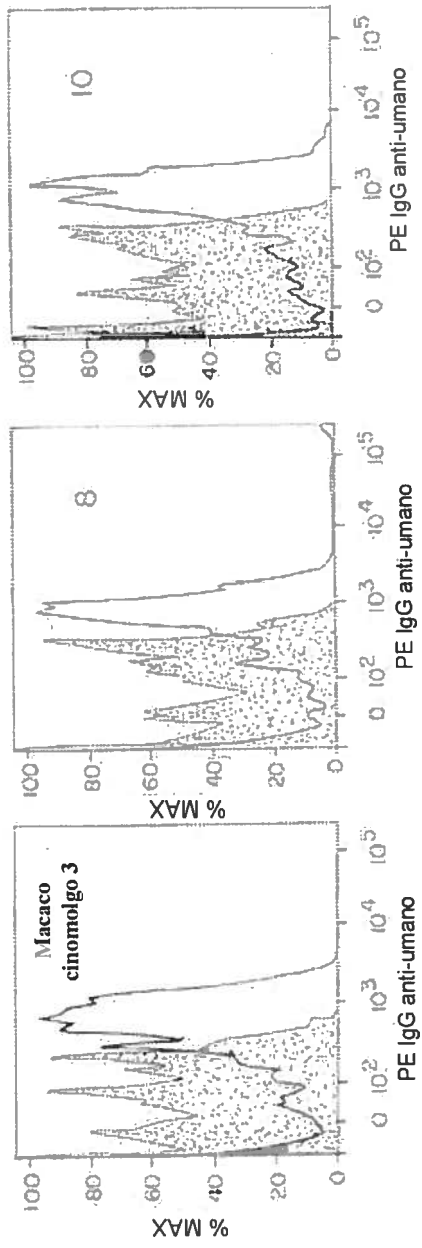


FIG 26C

Ing. *[Signature]* Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

FIG 27A



Ing. Inés Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 27B

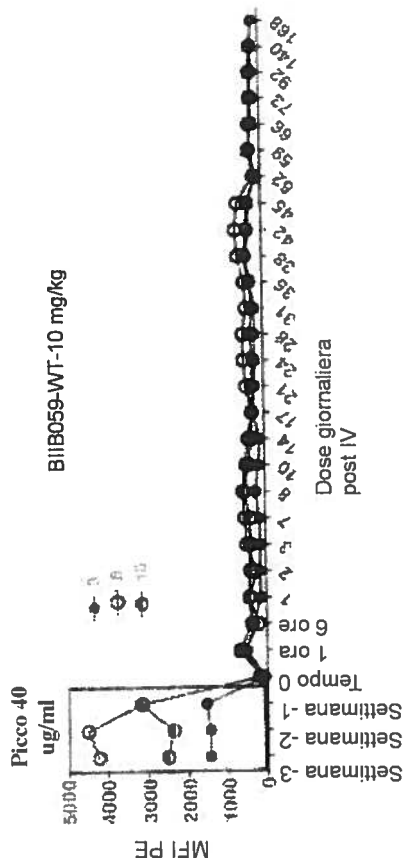
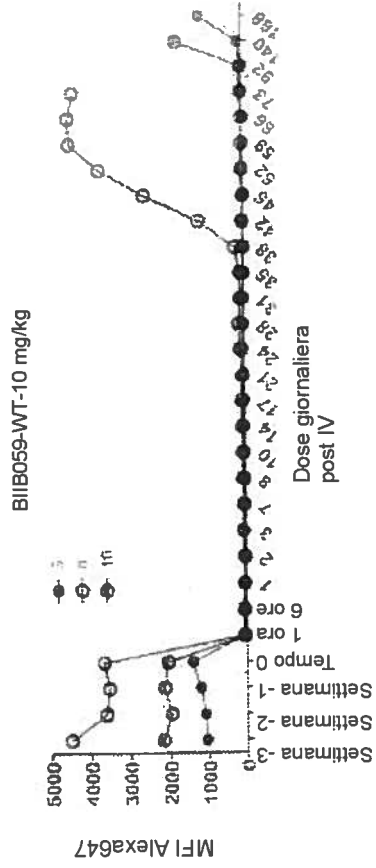
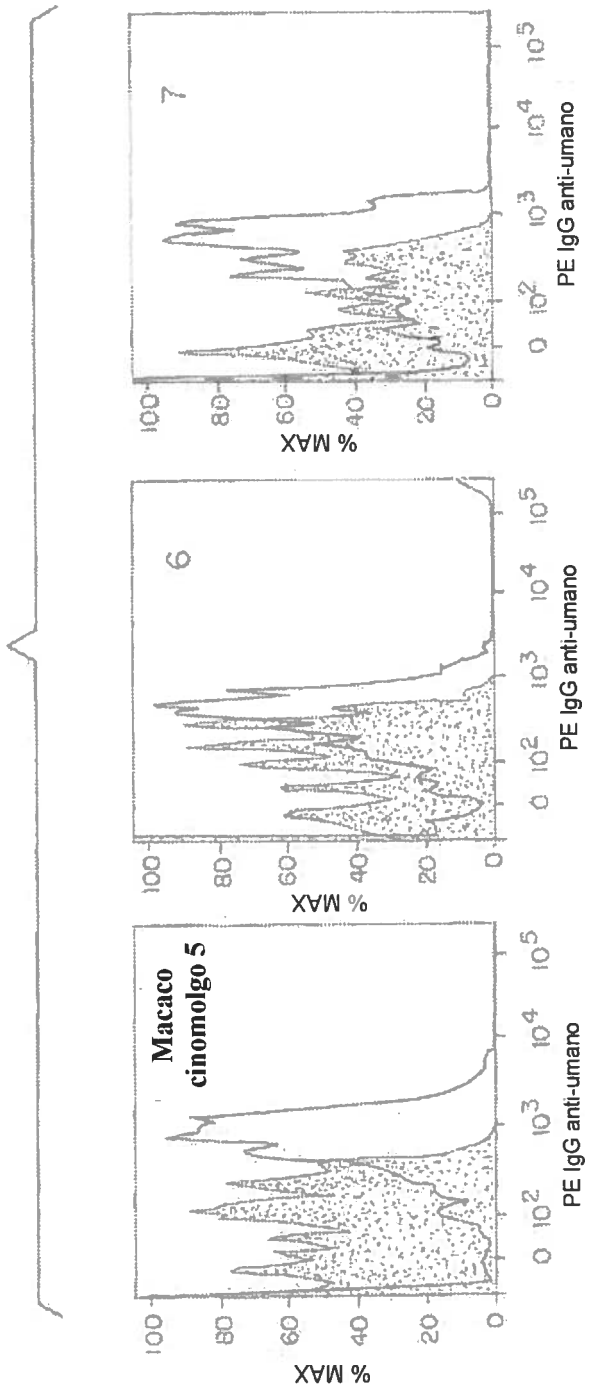


FIG 27C



Ing. Irres Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 28A



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 28B

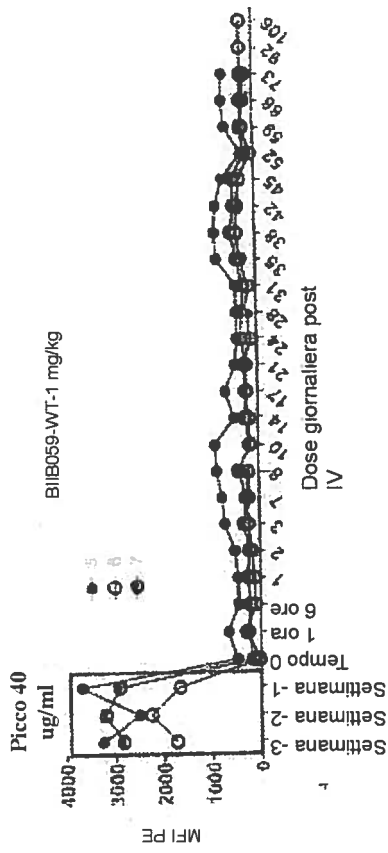
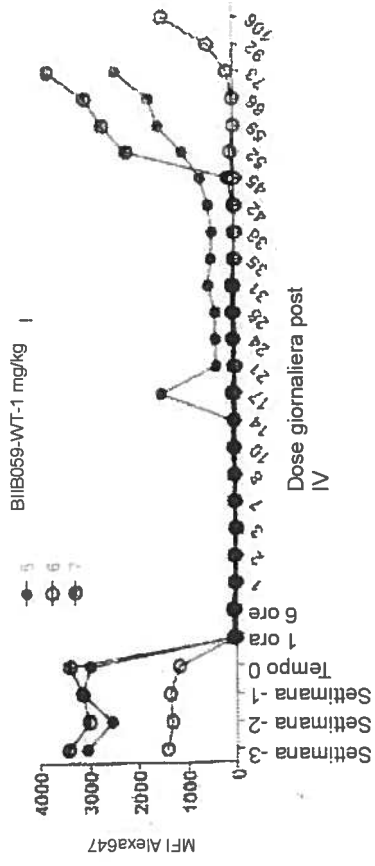


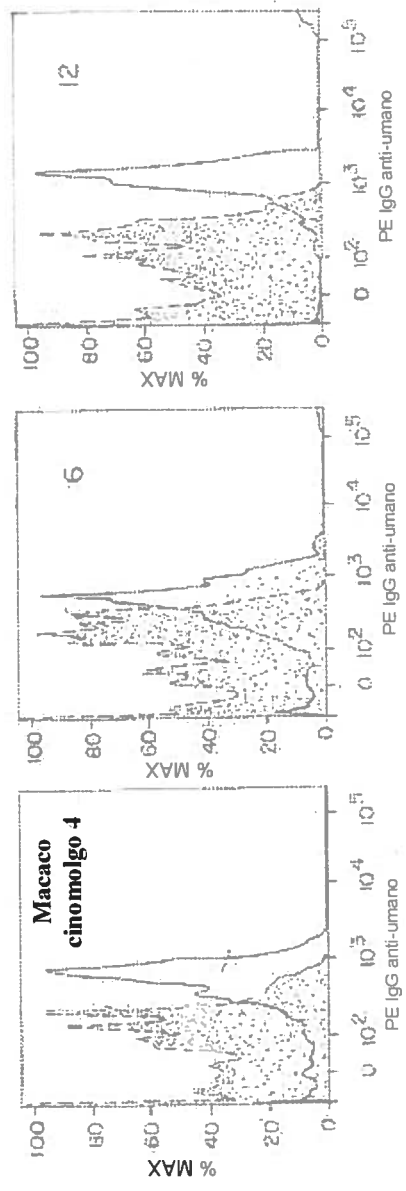
FIG 28C



Ing. Ilpes Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 29A

31/63



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n. SBM-041R

FIG 29B

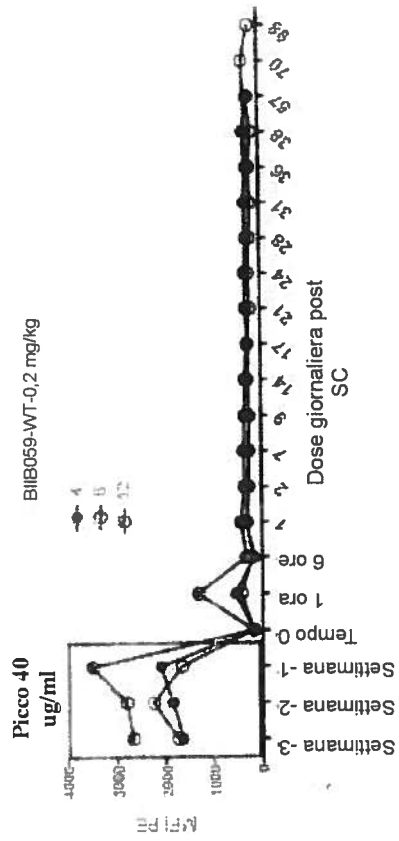
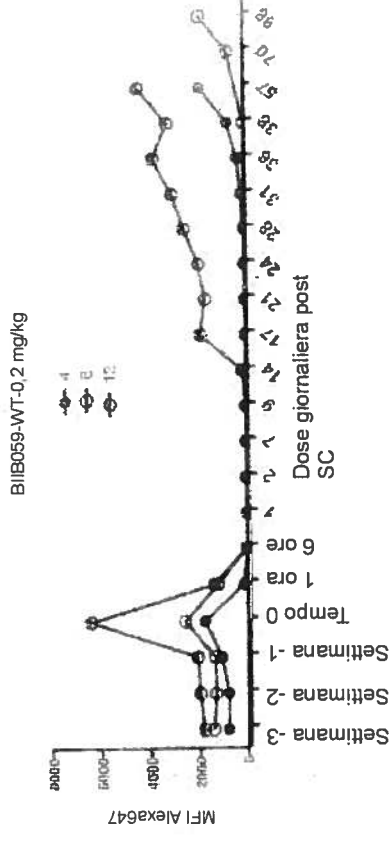


FIG 29C



Ing. Ures Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 30/-1

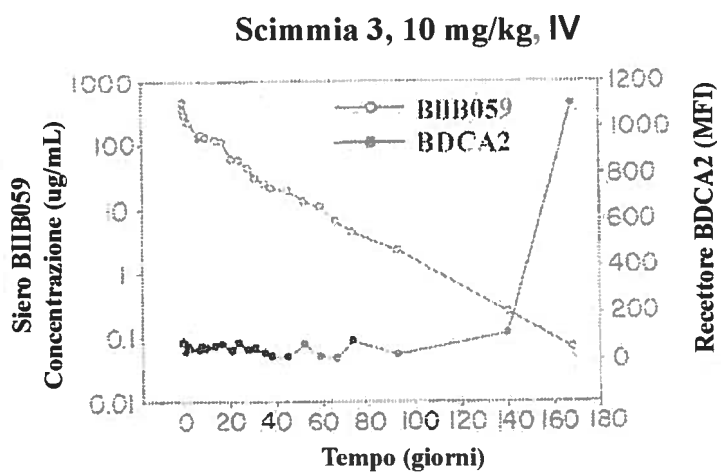
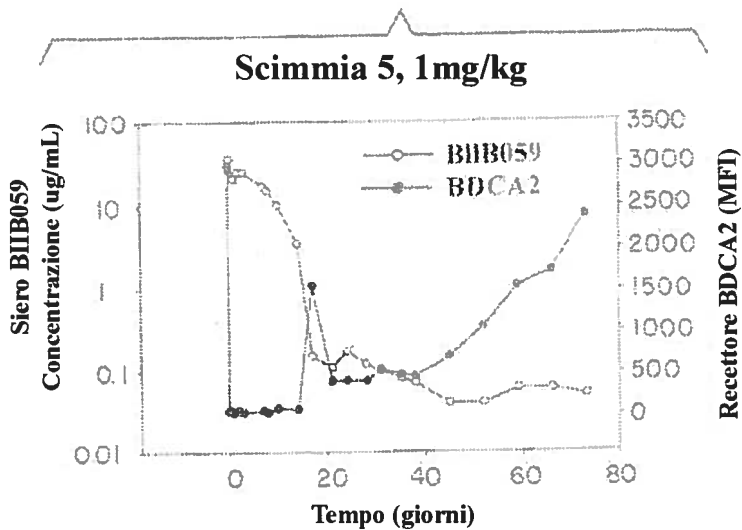
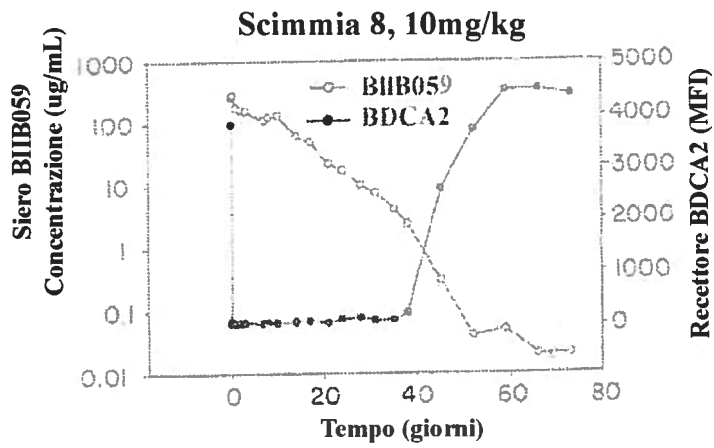
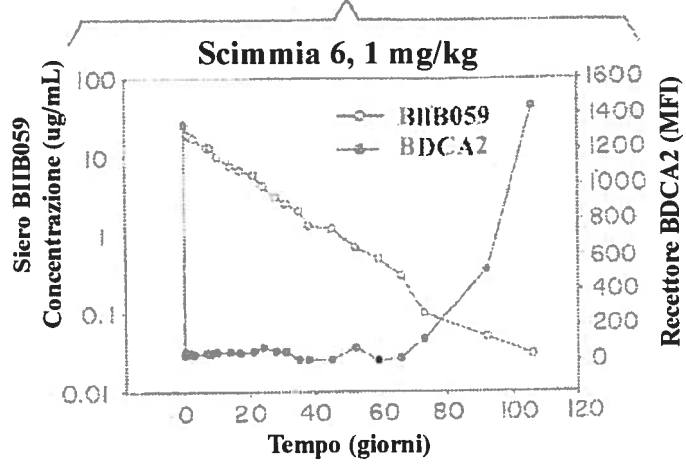


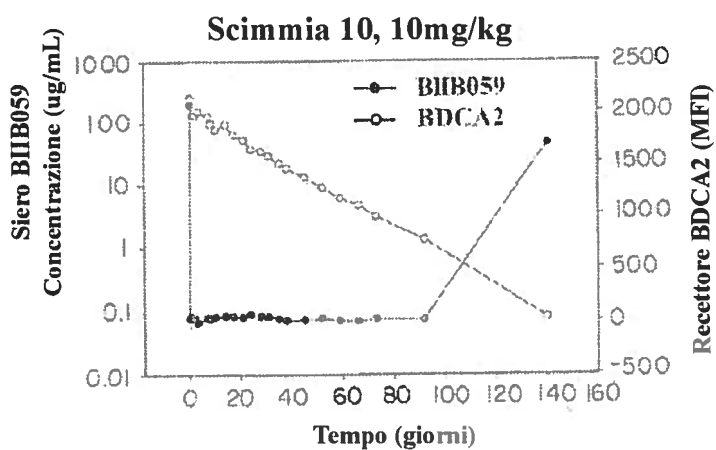
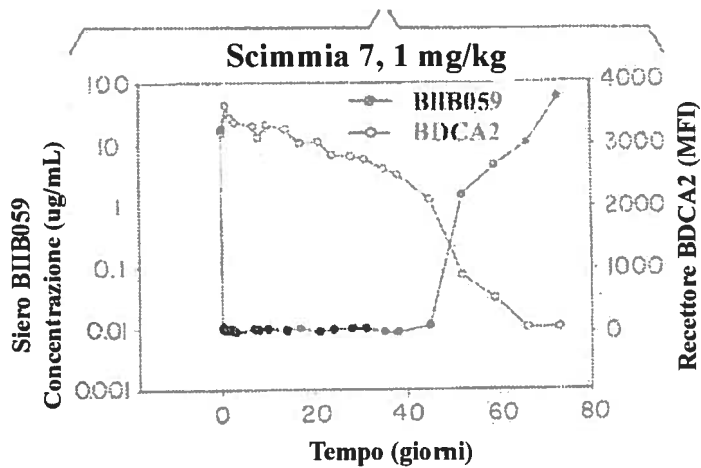
Fig. Mes Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

FIG 30/-2



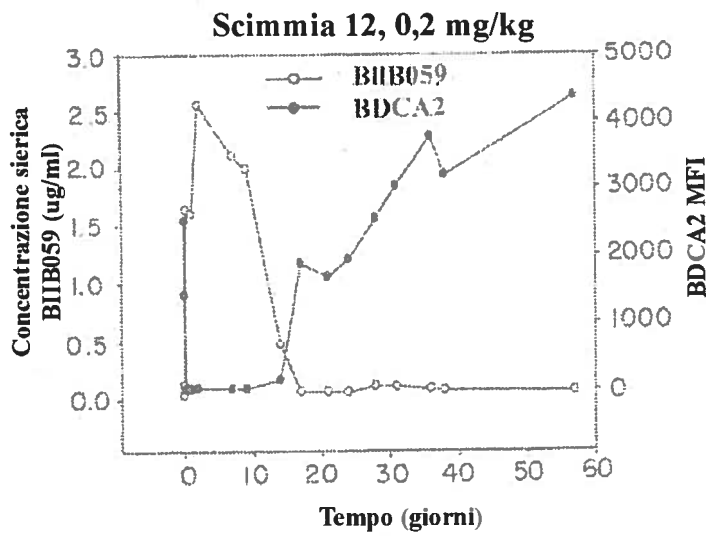
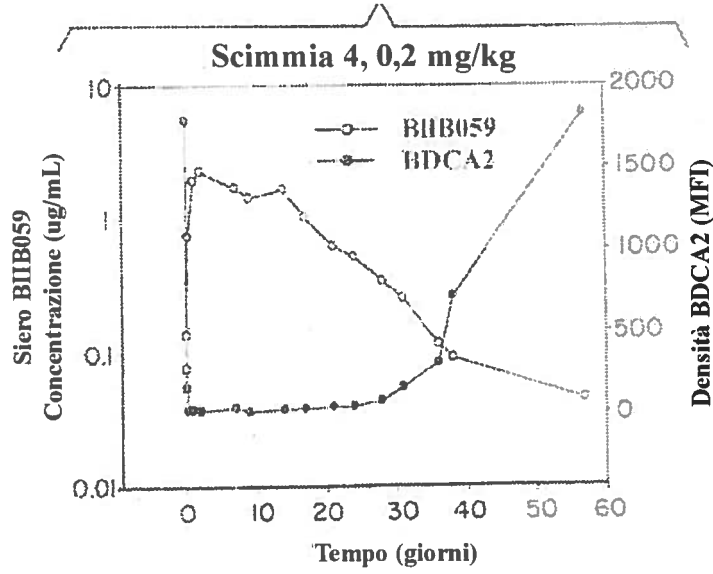
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 30/-3



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n. 22/USBM-041R

FIG 31/-1



Ing. Des Sangiacomo
Consulente in P.I. n. 208/USBM-041R

FIG 31/-2

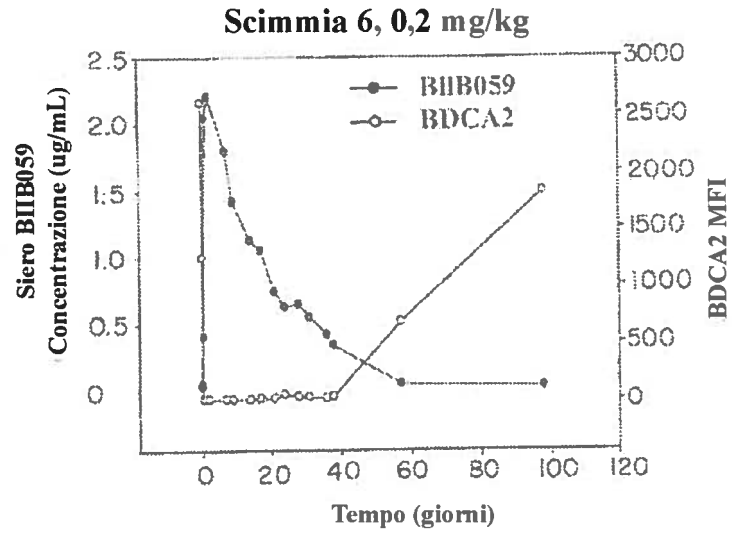
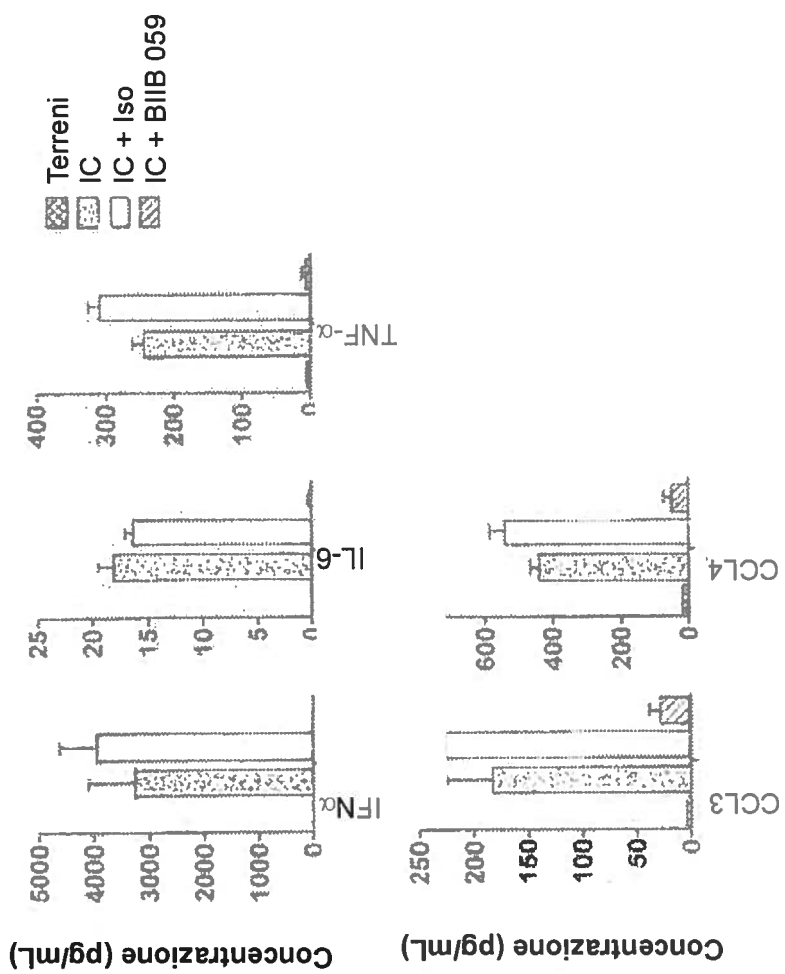
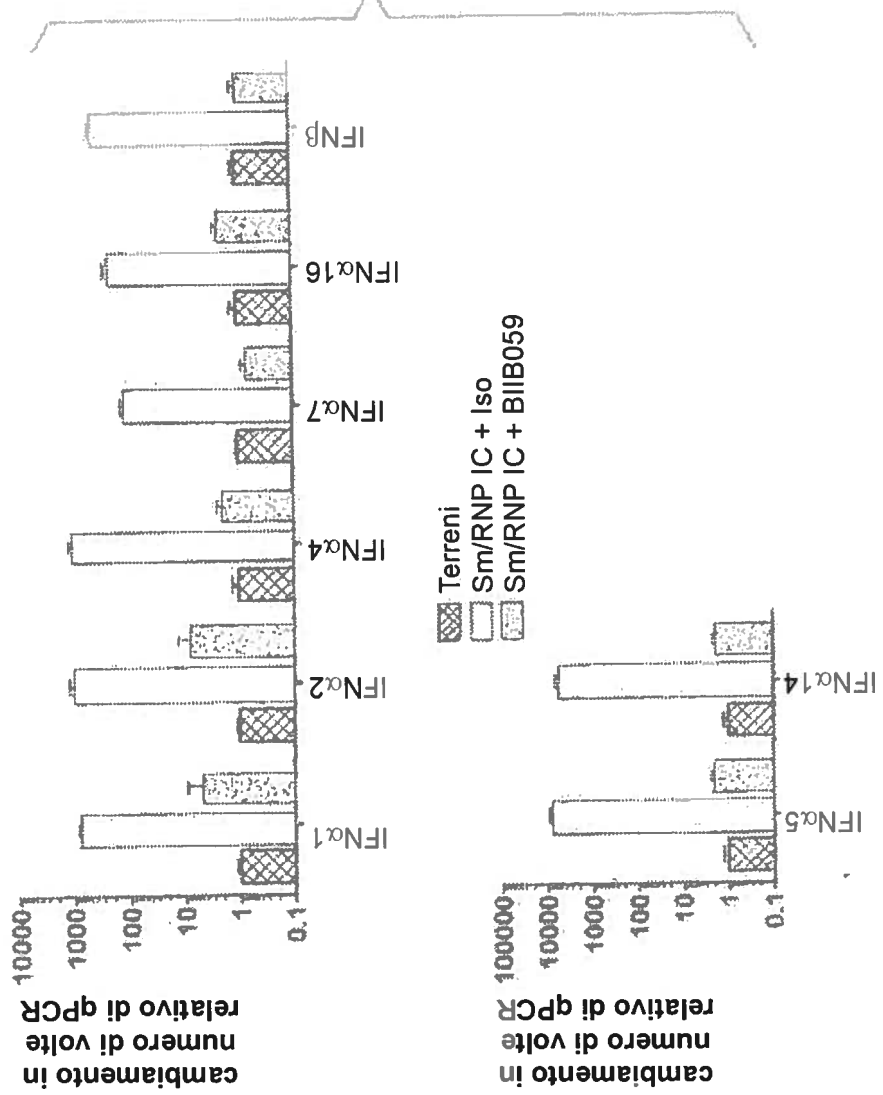


FIG. 33



Ing. Inés Sangiacomo
Consulente in P. I. N. 23581/2015
N. 23581/2015

FIG. 34



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 35A

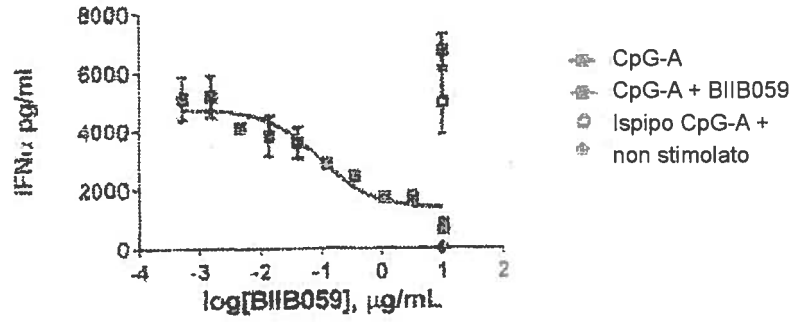


FIG 35B

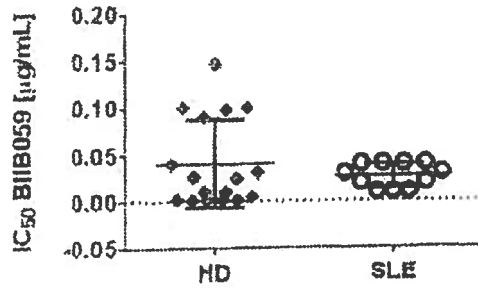
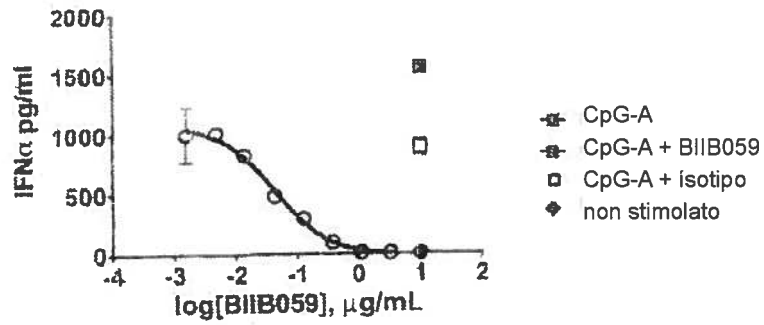


FIG 35C

FIG 36A

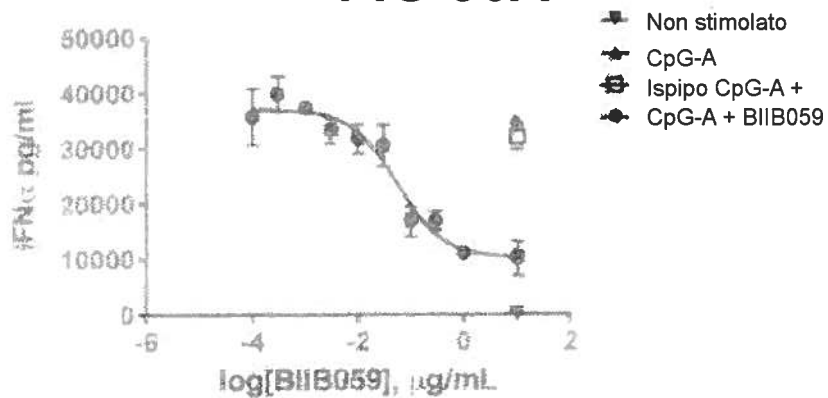


FIG 36B

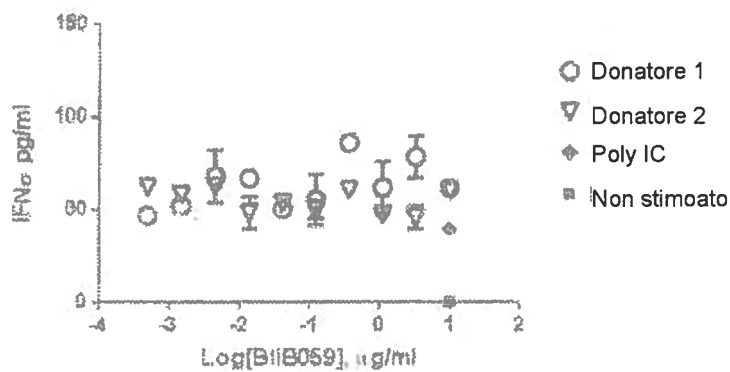
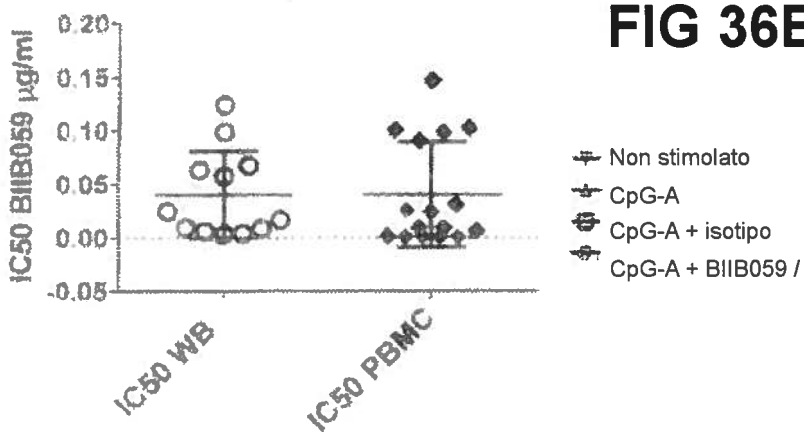


FIG. 37

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n. 2/SBM-041R

FIG 38B

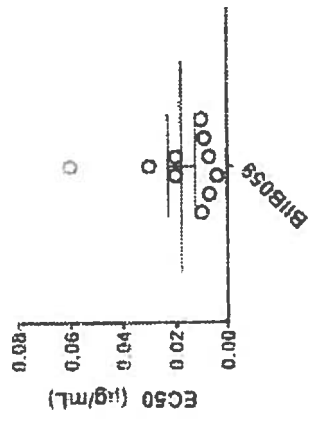


FIG 38A

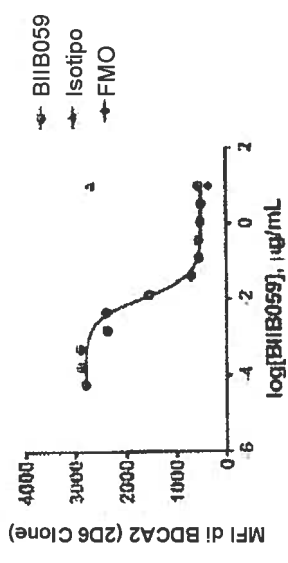
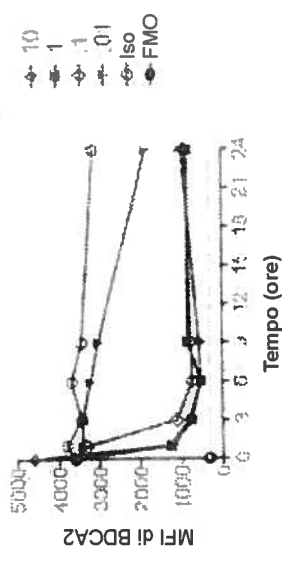


FIG. 39



Ing. Ives Sangiacomo
 Consulente in P. I. n° 65BM-041R

FIG. 40

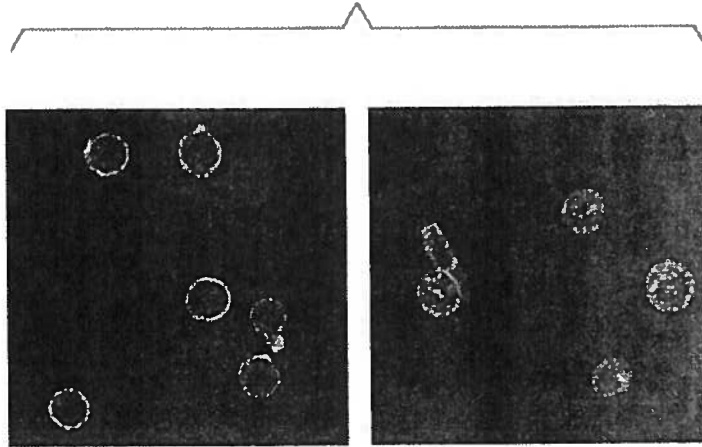


FIG. 41

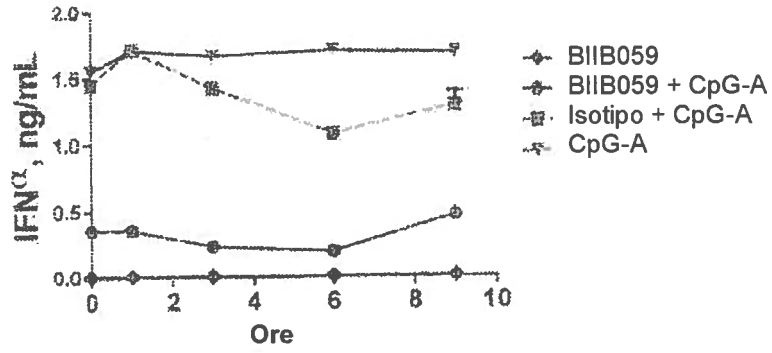
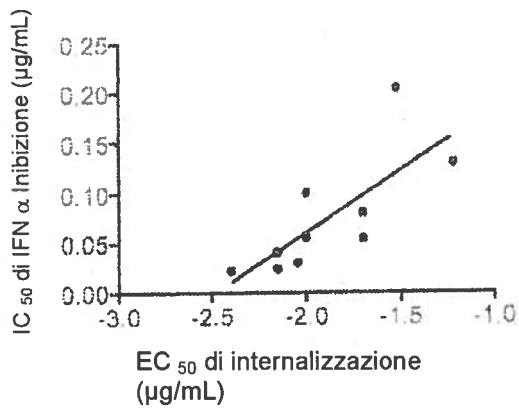


FIG. 42



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

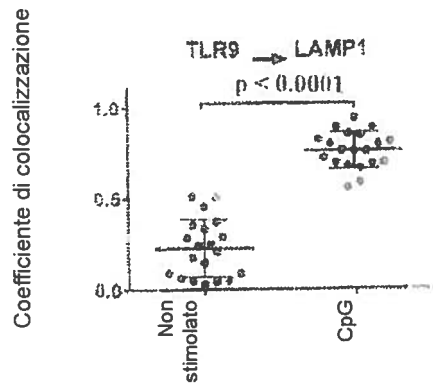


FIG 43A

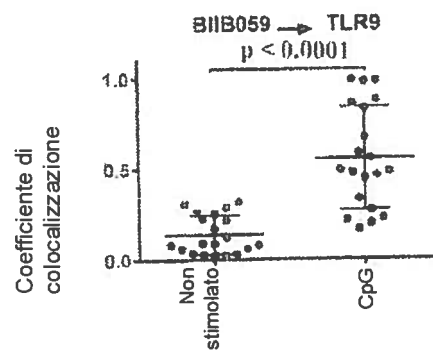


FIG 43B

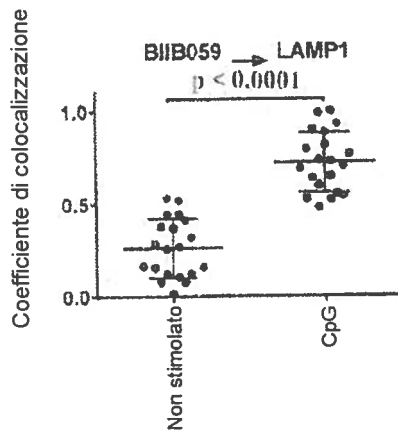


FIG 43C

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

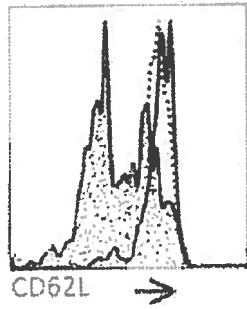


FIG 44A

FIG 44B

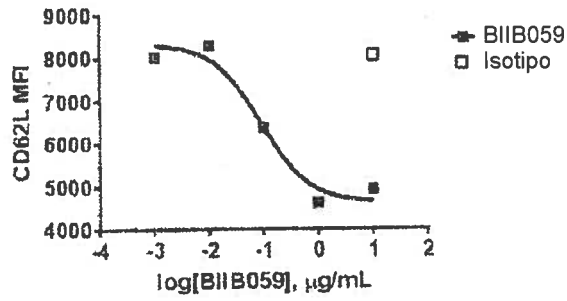
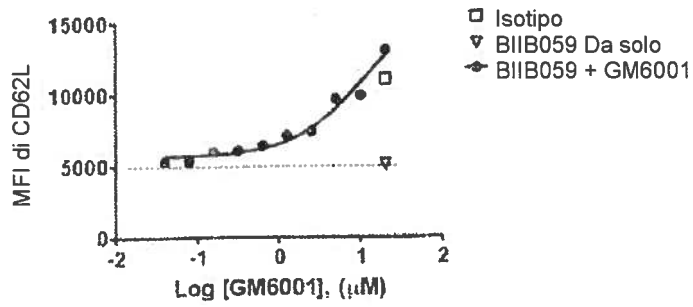


FIG. 45



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in F.I. n° USBM-041R

FIG 46A

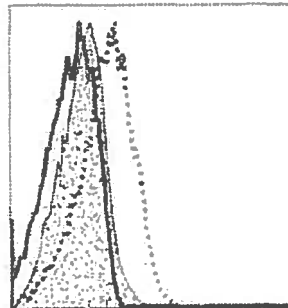
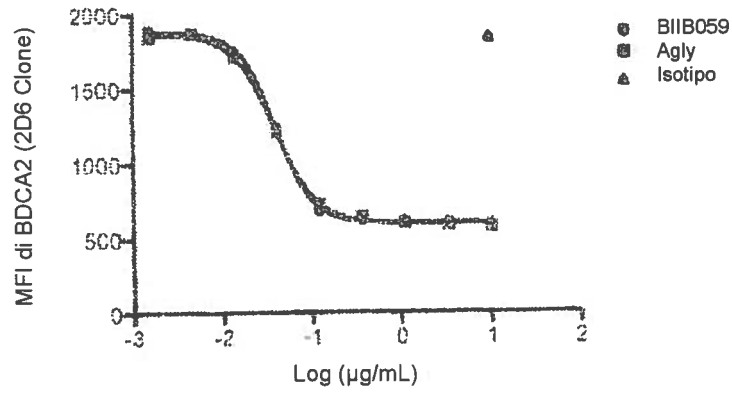


FIG 46B

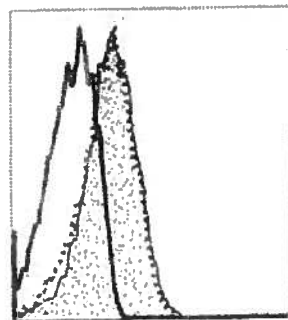


FIG 46C

FIG 46D

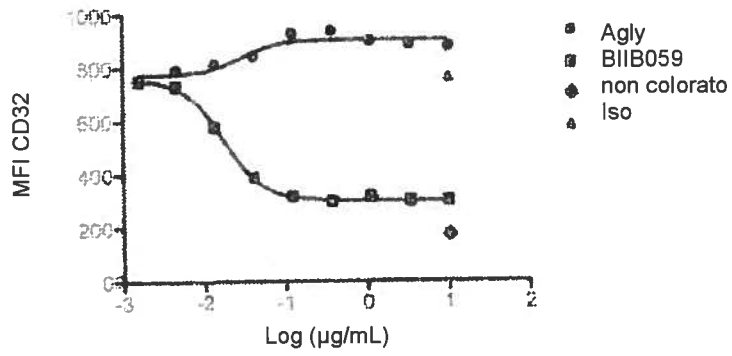
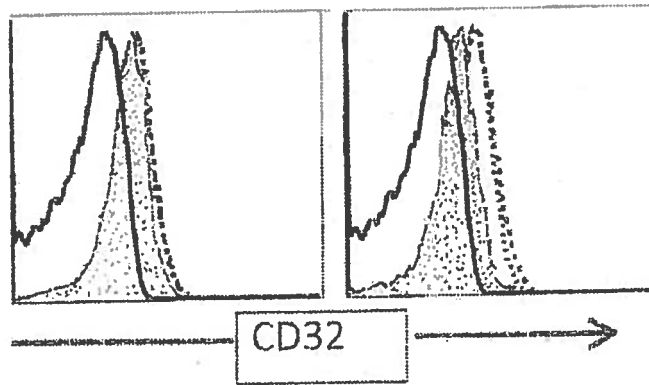


FIG 46E

FIG 46F





Ing. Des. Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 47A

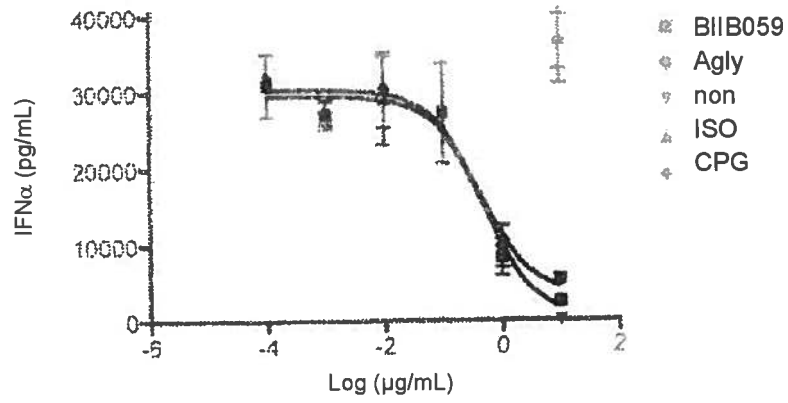
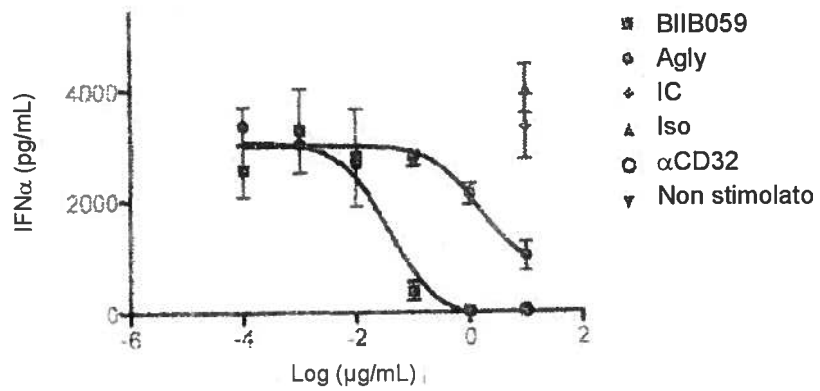


FIG 47B




Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 48A

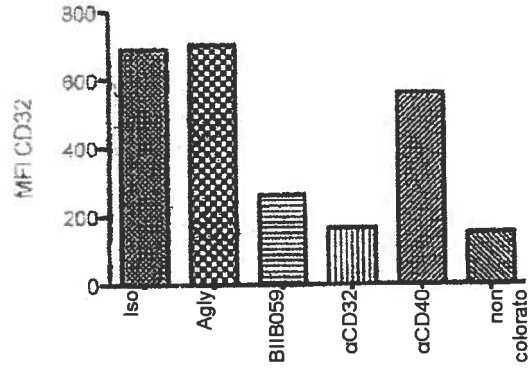


FIG 48B

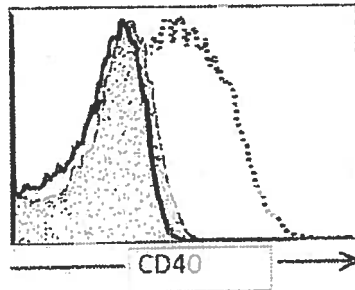
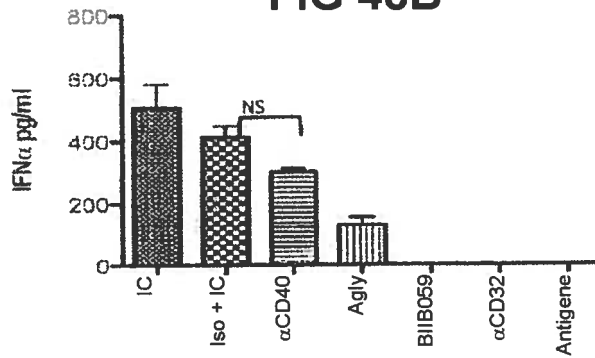


FIG 48C

FIG. 49

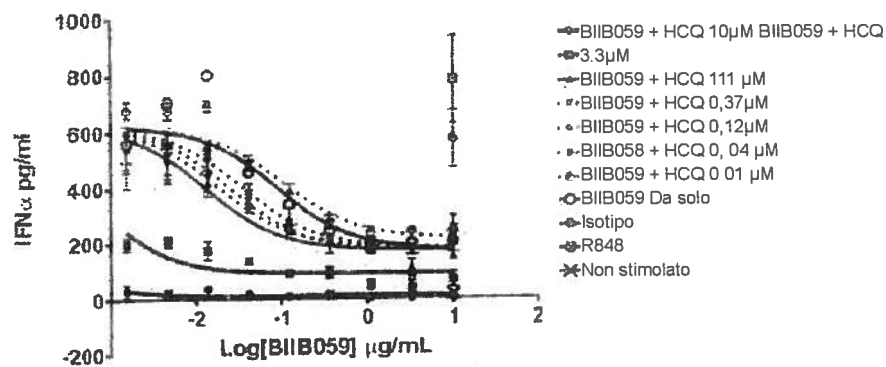
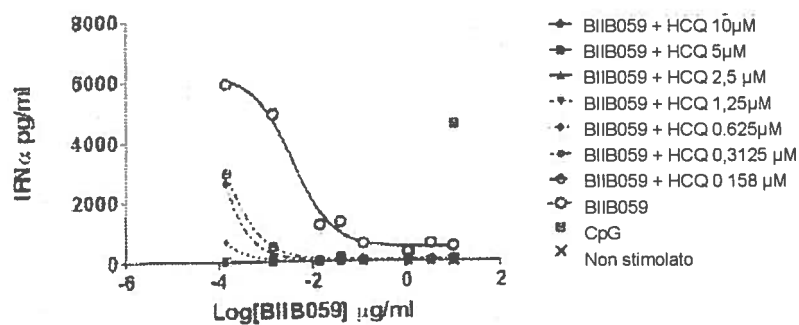


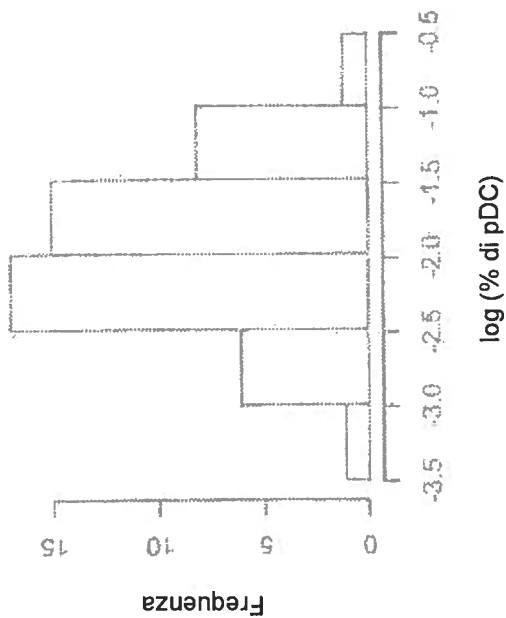
FIG. 50



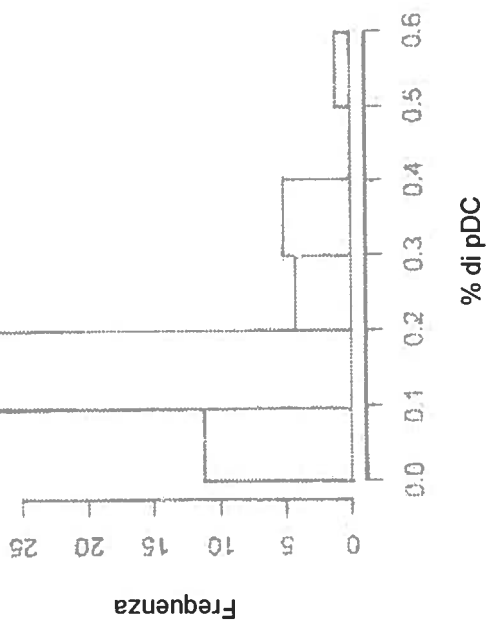
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 51

La distribuzione del registro (percentuale pDC) (basale)



La distribuzione della percentuale di pDC (basale)



Ing. *[Signature]* Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

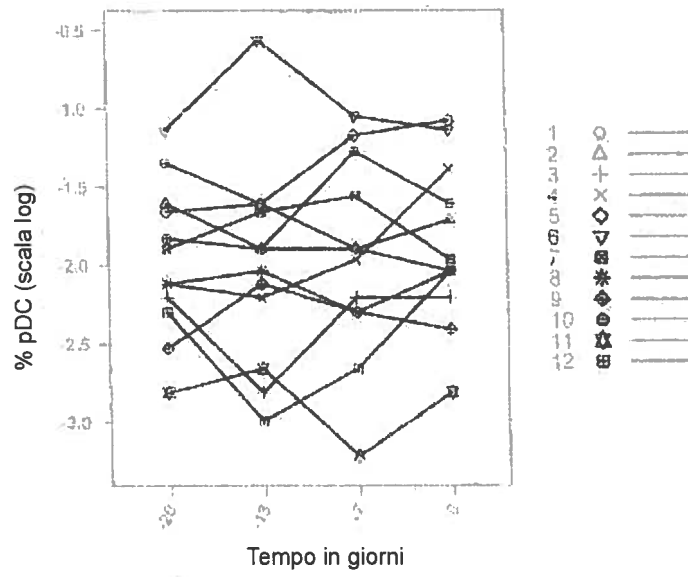


FIG 52

Ing. Ines Zangiaco
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

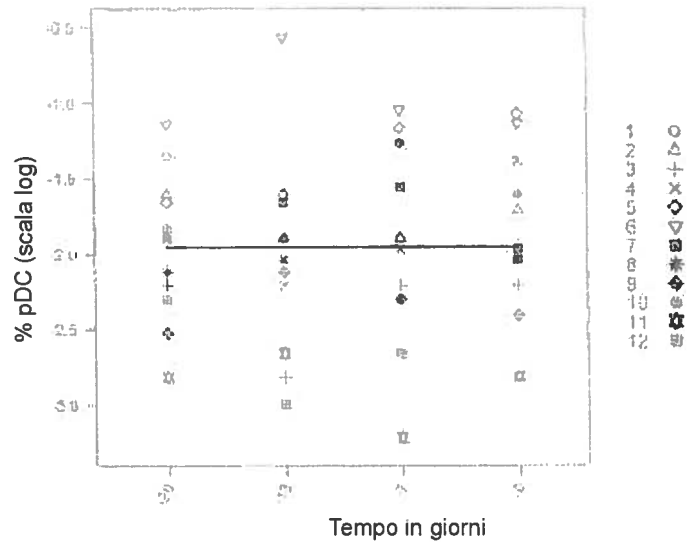
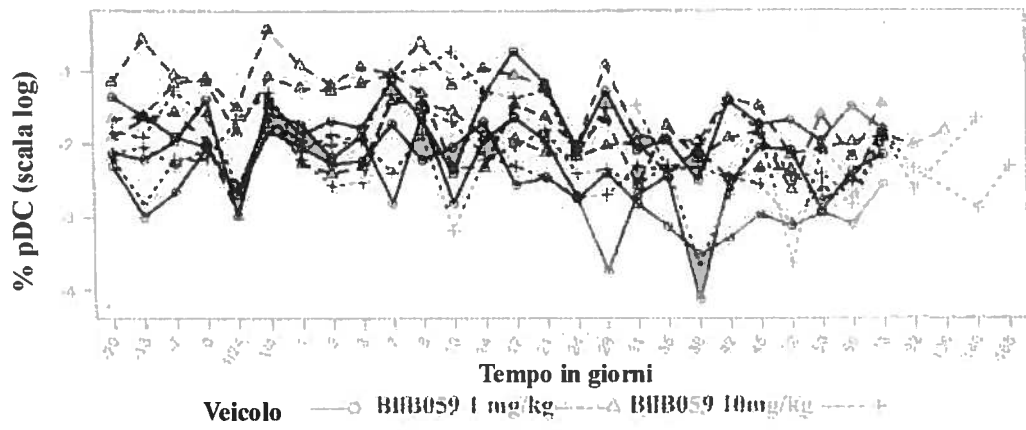


FIG 53

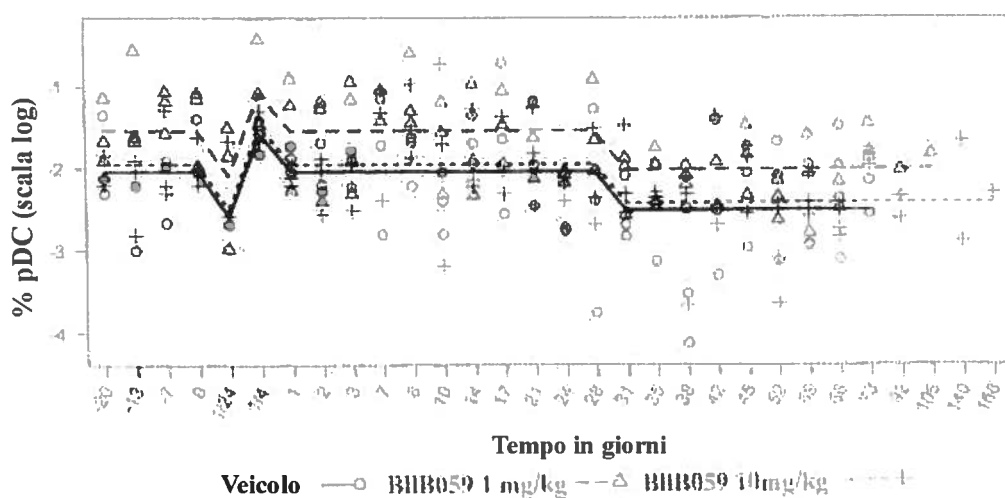
Ing. Ives Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

FIG 54



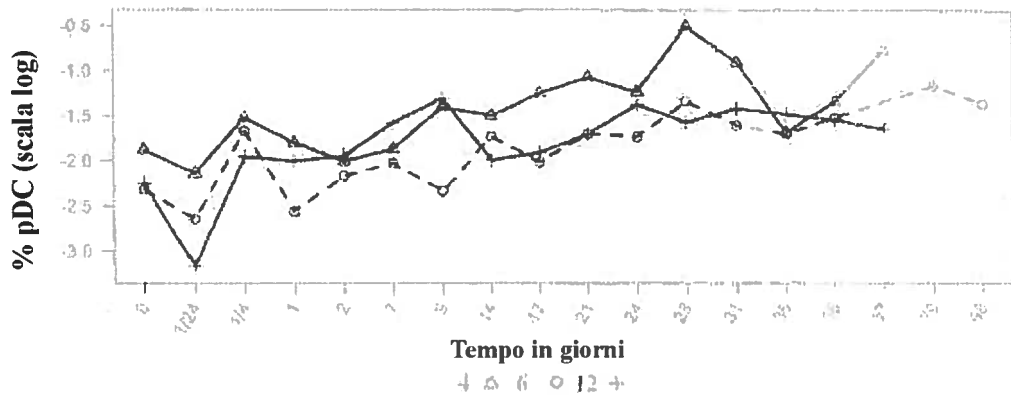
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

FIG 55



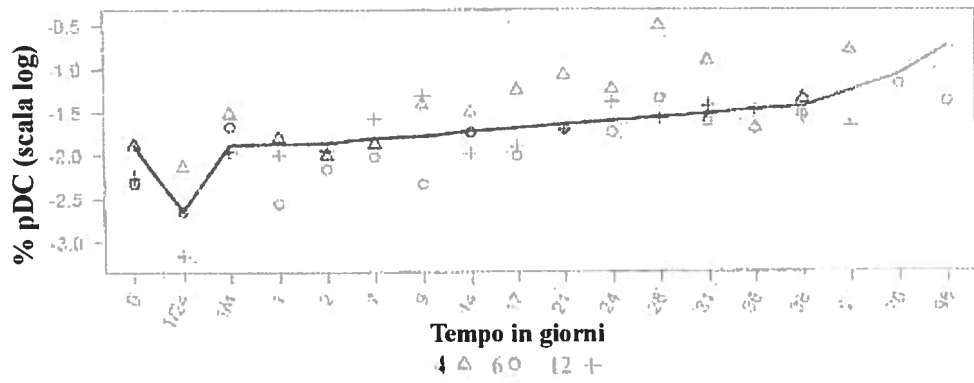
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 56



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

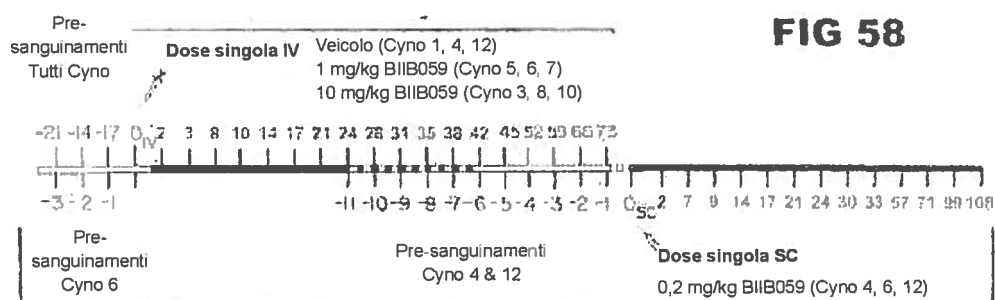
FIG 57



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P. n° USBM-041R

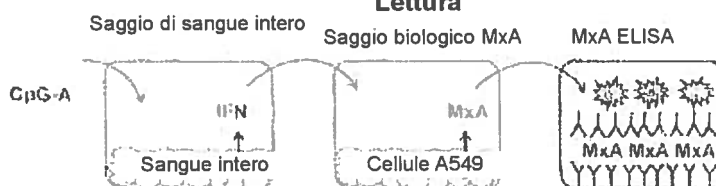
Studio della dose endovenosa

FIG 58



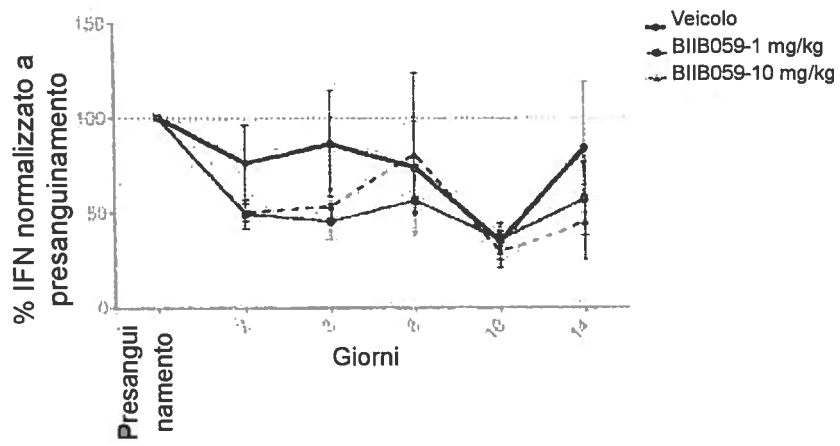
Studio della dose sottocutanea

Letture



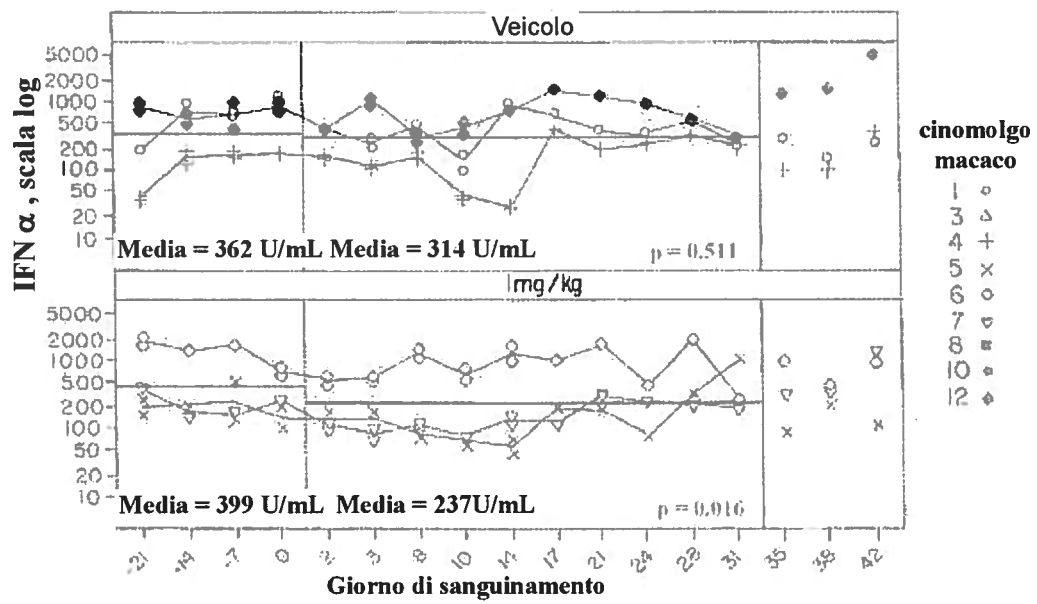
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

FIG 59



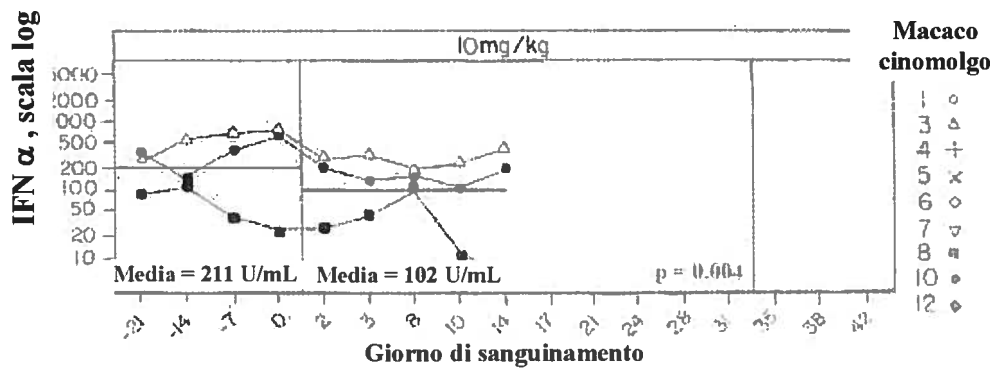
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 60-1



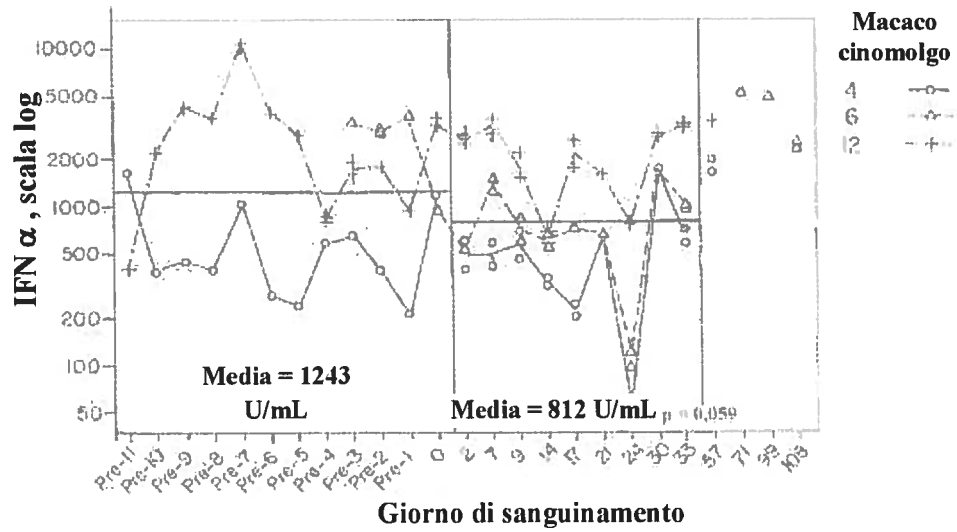
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 60/-2



Ing. *[Signature]* Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG 61



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.V. n° USBM-041R