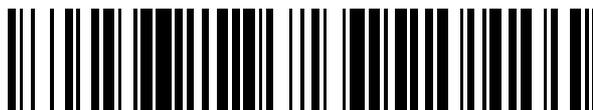


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 710**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03731385 .5**
96 Fecha de presentación: **28.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1534753**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **ISÓMERO POSICIONAL DE PEG DE UN ANTICUERPO ANTI-TNFalfa (CDP870).**

30 Prioridad:
28.05.2002 US 383765 P
20.03.2003 WO PCT/US03/08608

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2011

73 Titular/es:
UCB PHARMA, S.A.
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
MOZIER, Ned, M.

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 710 T3

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

DESCRIPCIÓN

Isómero posicional de PEG de un anticuerpo anti-TNF α (CDP870).

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud internacional n° de serie PCT/US 30/08608, presentada el 20 de marzo, 2003, y bajo el Título 35, Código de EEUU §119, de la solicitud provisional de EEUU n° de serie 60/383.765, presentada el 28 de mayo, 2002, que se incorporan como referencia en su totalidad como si estuvieran escritas en la presente.

Campo de la invención

10 La presente descripción se refiere a isómeros posicionales de PEG de proteínas recombinantes. De modo más específico, se refiere a los isómeros posicionales de PEG de un anticuerpo que tiene especificidad por los determinantes antigénicos del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) humano. De modo más específico, se refiere a los isómeros posicionales de PEG de CDP870. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden los isómeros posicionales de PEG y a los usos terapéuticos del anticuerpo.

Antecedentes de la invención

15 En una molécula de anticuerpo existen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tienen, en su extremo N-terminal, un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto por cuatro regiones de marco (FR) que alternan con tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los restos en los dominios variables se numeran, de modo convencional, según un sistema concebido por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EEUU (en lo sucesivo "Kabat *et al.* (*supra*)"). Este sistema de numeración se emplea en la presente memoria descriptiva, excepto cuando se indique lo contrario.

20 Las denominaciones de restos de Kabat no siempre se corresponde directamente con la numeración lineal de los restos aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos que la numeración de Kabat estricta, que se corresponden con un acortamiento de un componente estructural o con una inserción en un componente estructural, tanto un marco como una CDR, de la estructura básica del dominio variable. La numeración de Kabat correcta de los restos puede determinarse para un anticuerpo concreto mediante el alineamiento de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo, con una secuencia numerada según Kabat "patrón".

25 Las CDR del dominio variable de cadena pesada se localizan en los restos 31-335 (CDRH1), los restos 50-65 (CDRH2), y los restos 95-102 (CDRH3), según la numeración de Kabat.

30 Las CDR del dominio variable de cadena ligera se localizan en los restos 24-34 (CDRL1), los restos 50-65 (CDRL2), y los restos 89-97 (CDRL3), según la numeración de Kabat.

35 La construcción de anticuerpos con CDR injertadas se describe en la solicitud de patente europea EP-A-0239400, que describe un proceso en el que las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injertan en las regiones de marco de los dominios variables de una inmunoglobulina humana mediante mutagénesis dirigida específica de sitio utilizando oligonucleótidos largos. Las CDR determinan la especificidad de unión al antígeno de los anticuerpos, y son secuencias peptídicas relativamente cortas portadas por las regiones de marco de los dominios variables.

40 El primer trabajo sobre la humanización de anticuerpos monoclonales mediante injertos de CDR se realizó con anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos sintéticos, tales como NP. Sin embargo, se han descrito ejemplos en los que un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce a la lisozima, y un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un antígeno sobre células T humanas se han humanizado mediante injertos de CDR en Verhoeven *et al.* (Science, 239, 1534-1536, 1988) y Riechmann *et al.* (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

45 Riechmann *et al.* descubrieron que la transferencia sólo de CDR (según se define en Kabat (Kabat *et al.* (*supra*)), y Wu *et al.*, J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970) no es suficiente para proporcionar una actividad de unión al antígeno satisfactoria en el producto con CDR injertadas. Se descubrió que debe alterarse una serie de restos del marco para que se correspondan con los de la región de marco donante. Los criterios propuestos para seleccionar los restos del marco que es necesario alterar se describen en la solicitud de patente internacional WO 90/07861.

Se han publicado una serie de informes que analizan los anticuerpos con CDR injertadas, que incluye Vaughan *et al.* (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

50 El TNF α es una citoquina proinflamatoria que es liberada por las células del sistema inmunológica e interacciona con éstas. Por tanto, el TNF α es liberado por macrófagos que han sido activados por lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas. Como tal, el TNF α parece ser un mediador endógeno de importancia capital implicado en el desarrollo y la patogénesis del choque endotóxico asociado con la sepsis bacteriana. También se ha demostrado que el TNF α está sobrerregulado en una serie de enfermedades humanas, que incluyen enfermedades crónicas,

tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la esclerosis múltiple. Ratones transgénicos para la TNF α humana producen altos niveles de TNF α constitutivamente, y desarrollan una poliartritis espontánea y destructiva que se parece a la artritis reumatoide (Kaffer *et al.*, EMBO J., 10, 4025-4031, 1991). Por tanto, el TNF α se denomina una citoquina proinflamatoria.

5 También se han descrito anticuerpos monoclonales contra el TNF α en la técnica anterior. Meager *et al.* (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) describen anticuerpos monoclonales murinos contra TNF α recombinante. Fendly *et al.* (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) describen el uso de anticuerpos monoclonales murinos contra TNF α recombinante para la definición de epitopos neutralizantes sobre el TNF. Shimamoto *et al.* (Immunology Letters, 17, 311-318, 1988) describen el uso de anticuerpos monoclonales murinos contra TNF7 y su uso para prevenir el choque
10 endotóxico en ratones. Además, en la solicitud de patente internacional WO 92/11383, se describen anticuerpos recombinantes, que incluyen anticuerpos con CDR injertadas, específicos para el TNF α . Rankin *et al.* (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) describen el uso de dichos anticuerpos con CDR injertadas para el tratamiento de la artritis reumatoide. El documento US-A-5.919.452 describe anticuerpos quiméricos anti-TNF y su uso para tratar patologías asociadas con la presencia de 5 TNF.

15 Se han propuesto anticuerpos contra el TNF α para la profilaxis y el tratamiento del choque endotóxico (Beutler *et al.*, Science, 234, 470-474, 1985). Bodmer *et al.* (Critical Care Medicine, 21, S441-S336, 1993), y Wherry *et al.* (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) analizan el potencial terapéutico de anticuerpos anti-TNF α para el tratamiento del choque séptico. El uso de los anticuerpos anti-TNF α para el tratamiento del choque séptico también es analizado por Kirschenbaum *et al.* (Critical Care Medicine, 26, 1625-1628, 1998). La artritis inducida por colágeno también
20 puede tratarse de modo eficaz utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TNF α (Williams *et al.*, PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992).

Se encuentran niveles mayores de TNF α en el fluido sinovial y en la sangre periférica de pacientes que padecen artritis reumatoide. Cuando se administran agentes bloqueantes del TNF α a pacientes que padecen artritis reumatoide, los agentes reducen la inflamación, mejoran los síntomas, y retrasan los daños en las articulaciones
25 (McKown *et al.*, Arthritis Reum., 42, 1204-1208, 1999).

El uso de anticuerpos anti-TNF α para el tratamiento de la artritis reumatoide y de la enfermedad de Crohn se analiza en Feldman *et al.* (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini *et al.* (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997), y en Feldman *et al.* (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Los anticuerpos contra TNF α utilizados en estos tratamientos son, en general, anticuerpos quiméricos, tales como los descritos en el documento
30 US-A-5919452.

En la actualidad se ha autorizado la comercialización de dos productos bloqueantes del TNF α para el tratamiento de la artritis reumatoide. El primero, denominado etanercept, es comercializado por Immunex Corporation como Enbrel™. Es una proteína de fusión recombinante que comprende dos dominios del receptor de TNF soluble p75 unidos a la porción Fc de una inmunoglobulina humana. El segundo, denominado infliximab, es comercializado por
35 Centocor Corporation como Remicade™. Es un anticuerpo quimérico que tiene dominios variables anti-TNF α murinos y dominios constantes de IgG I humanos.

Las moléculas de anticuerpos anti-TNF α recombinantes de la técnica anterior en general tienen una afinidad reducida por el TNF α comparado con los anticuerpos a partir de los cuales se derivan las regiones variables o las CDR, en general deben producirse en células de mamífero y son caras de fabricar. Los anticuerpos anti-TNF α de la
40 técnica anterior se describen en Stephens *et al.* (Immunology, 85, 668-674, 1995), los documentos GB-A-2.246.570 y GB-A-2.297.145.

El documento WO 01/94585 describe moléculas de anticuerpo que tienen una alta afinidad por el TNF α y baja inmunogenicidad en seres humanos, que pueden utilizarse repetidamente y que pueden producirse de modo fácil y eficaz, para tratar enfermedades inflamatorias crónicas.

45 **Sumario de la invención**

Esta descripción comprende isómeros posicionales de PEG de proteínas recombinantes, preferiblemente isómeros posicionales de PEG de un anticuerpo que tiene especificidad por determinantes antigénicos del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α). La presente invención se refiere también a composiciones que comprenden los isómeros y a los usos terapéuticos del anticuerpo.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de CDP870, el apareamiento de disulfuros intramolecular, el apareamiento de disulfuros intermolecular predominante entre las cadenas ligera y pesada y la cisteína para la conjugación del PEG.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del isómero posicional de PEG de CDP870, estando el PEG unido a Cys 214 de la cadena ligera (CDP870-PEG-1214). Los restos de interés (Cys-214

de la cadena ligera, Cys-221 de la cadena pesada, y Cys-227 de la cadena pesada) están marcados.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona isómeros posicionales de PEG de proteínas recombinantes, que tienen un sitio de unión a PEG alternativo. Un "isómero posicional de PEG de un anticuerpo" se define como un anticuerpo que tiene un sitio de unión a PEG distinto del sitio de unión a PEG predominante. Preferiblemente, el isómero posicional de PEG es de un anticuerpo que tenga especificidad por los determinantes antigénicos del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) humano. Preferiblemente, el anticuerpo de TNF α es un anticuerpo de TNF α descrito en el documento WO 01/04585. Preferiblemente, el anticuerpo es CDP870.

El documento WO 01/04585 proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por TNF α , que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (según definen Kabat *et al.* (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como H1 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:1 del documento WO 01/94585) para CDRH1, como H2' en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:2 del documento WO 01/94585), o como H2 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:7 del documento WO 01/94585) para CDRH2, o como H3 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:3 del documento WO 01/94585) para CDRH3.

La molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 comprende al menos una CDR seleccionada de H1, H2' o H2 y H3 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:3 del documento WO 01/94585) para el dominio variable de cadena pesada. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos, y más preferiblemente las tres CDR en el dominio variable de cadena pesada.

En el documento WO 01/94585 se proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNF α humano, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (según definen Kabat *et al.* (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como L1 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:4 del documento WO 01/94585) para CDRL1, L2 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:5 del documento WO 01/94585) para CDRL2, o L3 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:6 del documento WO 01/94585) para CDRL3.

La molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 comprende al menos una CDR seleccionada de L1, L2 y LE (SEQ ID NO:4 a SEQ ID NO:6 del documento WO 01/94585) para el dominio variable de cadena ligera. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos, y más preferiblemente las tres CDR en el dominio variable de cadena ligera.

Las moléculas de anticuerpos del documento WO 01/94585 preferiblemente tienen una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (según definen Kabat *et al.* (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como H1 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:1 del documento WO 01/94585) para CDRH1, como H2' o H2 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:7 del documento WO 01/94585) para CDRH2, o como H3 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:3 del documento WO 01/94585) para CDRH3, y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (según definen Kabat *et al.* (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como L1 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:4 del documento WO 01/94585) para CDRL1, como L2 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:5 del documento WO 01/94585) para CDRL2, o como L3 en la figura 3 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:6 del documento WO 01/94585) para CDRL3.

Las CDR que aparecen en SEQ ID NO:1 y 3 a 7 del documento WO 01/94585, y en la figura 3 del documento WO 01/94585, se derivan de un anticuerpo monoclonal de ratón de hTNF40. Sin embargo, SEQ ID NO:2 del documento WO 01/94585 consiste en una CDR híbrida. La CDR híbrida comprende parte de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón de hTNF40 (SEQ ID NO:7 del documento WO 01/94585) y parte de la CDR2 de cadena pesada de una secuencia de la región V de la línea germinal del grupo 3 humana.

Las secuencias completas de los dominios variables del anticuerpo de hTNF40 de ratón se muestran en la figura 6 del documento WO 01/94585 (cadena ligera) (SEQ ID NO:99 del documento WO 01/94585) y la figura 7 del documento WO 01/94585 (cadena pesada) (SEQ ID NO:100 del documento WO 01/94585). Este anticuerpo de ratón se denomina en lo sucesivo "anticuerpo donante".

Una primera realización alternativa del documento WO 01/94585 es el anticuerpo monoclonal de ratón de hTNF40 que tiene las secuencias del dominio variable de cadena ligera y pesada mostradas en la figura 6 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:99 del documento WO 01/94585) y la figura 7 del documento WO 01/94585 (SEQ ID NO:100 del documento WO 01/94585), respectivamente. La región constante de la cadena ligera de hTNF40 es kappa, y la región constante de la cadena pesada es IgG2a.

En una segunda realización alternativa del documento WO 01/94585, el anticuerpo según cualquiera del primer y

segundo aspecto del documento WO 01/94585 es una molécula de anticuerpo quimérica de ratón/humana, denominada en la presente molécula de anticuerpo de hTNF40 quimérica. La molécula de anticuerpo quimérica comprende los dominios variables del anticuerpo monoclonal de ratón de hTNF40 (SEQ ID NO:99 y 100 del documento WO 01/94585) y dominios constantes humanos. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de hTNF40 quimérica comprende el dominio C kappa humano (Hieter *et al.*, Cell, 22, 197-207, 1980; n° de registro de Genebank J00241) en la cadena ligera, y los dominios gamma 4 humanos (Flanagan *et al.*, Nature, 300, 709-713, 1982) en la cadena pesada.

En una tercera realización alternativa del documento WO 01/94585, el anticuerpo es una molécula de anticuerpo con CDR injertadas. La expresión "una molécula de anticuerpo con CDR injertadas", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una CDR híbrida) procedentes del anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertada en el marco de la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano).

Preferiblemente, dicho anticuerpo con CDR injertadas tiene un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas, así como una o más de las CDR del donante indicadas anteriormente.

Cuando las CDR se injertan, puede utilizarse cualquier secuencia de marco de la región variable del aceptor apropiada teniendo en cuenta la clase/tipo de anticuerpo donante del cual se derivan las CDR, incluyendo regiones marco de ratón, primate y humanas. Los ejemplos de marcos humanos del documento WO 01/94585 son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY, y PQM (Kabat *et al.* (*supra*)). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden utilizarse para la cadena pesada, REI puede utilizarse para la cadena ligera, y EU, LAY y POM pueden utilizarse para ambas cadena pesada y cadena ligera. Las regiones de marco preferidas para la cadena ligera son las regiones de marco del grupo 1 humanas mostradas en la figura 1 (SEQ ID NO:83, 85, 87 y 89 del documento WO 01/94585). Las regiones de marco preferidas para la cadena pesada son las regiones de marco del grupo 1 y del grupo 3 humanas mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO:91, 93, 95 y 97, y SEQ ID NO:106, 107, 108 y 109 del documento WO 01/94585), respectivamente.

En un anticuerpo con CDR injertadas del documento WO 01/94585 se prefiere utilizar, como anticuerpo aceptor, un anticuerpo que tenga cadenas que sean homólogas con las cadenas del anticuerpo donante. No es necesario que las cadenas pesada y ligera del aceptor se deriven del mismo anticuerpo y pueden comprender, si se desea, cadenas compuestas que tengan regiones de marco derivadas de diferentes cadenas.

Además, en un anticuerpo con CDR injertadas del documento WO 01/94585, no es necesario que las regiones de marco tengan exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, pueden cambiarse restos poco habituales por restos que aparezcan con más frecuencia para la cadena de esa clase o tipo de aceptor. Como alternativa, pueden cambiarse restos seleccionados en las regiones de marco del aceptor de forma que se correspondan con el resto que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo donante. Estos cambios deben mantenerse al grado mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar restos en las regiones de marco del aceptor que puede ser necesario cambiar se indica en el documento WO 91/09967.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas del documento WO 01/94585, si la cadena pesada del aceptor tiene regiones de marco del grupo 1 humanas (que se muestran en la figura 2 del documento WO 01/94585) (SEQ ID NO:91, 93, 95 y 97 del documento WO 01/94585), entonces las regiones de marco de la cadena pesada del aceptor comprenden, además de una o más CDR del donante, restos del donante en las posiciones 28, 69 y 71 (según Kabat *et al.* (*supra*)).

Como alternativa, si la cadena pesada del aceptor tiene regiones de marco del grupo 1, entonces las regiones de marco de la cadena pesada del aceptor comprenden, además de una o más CDR del donante, restos del donante en las posiciones 28, 38, 46, 67, 69 y 71 (según Kabat *et al.* (*supra*)).

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas del documento WO 01/94585, si la cadena pesada del aceptor tiene regiones de marco del grupo 3 humanas (que se muestran en la figura 2 del documento WO 01/94585) (SEQ ID NO:106, 107, 108 y 109 del documento WO 01/94585), entonces las regiones de marco de la cadena pesada del aceptor comprenden, además de una o más CDR del donante, restos del donante en las posiciones 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 y 78 (según Kabat *et al.* (*supra*)).

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas del documento WO 01/94585, si la cadena ligera del aceptor tiene regiones de marco del grupo 1 humanas (que se muestran en la figura 1 del documento WO 01/94585) (SEQ ID NO:83, 85, 87 y 89 del documento WO 01/94585), entonces las regiones de marco de la cadena ligera del aceptor comprenden restos del donante en las posiciones 46 y 60 (según Kabat *et al.* (*supra*)).

Los restos del donante son restos procedentes del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del cual se derivaron originariamente las CDR.

La molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 puede comprender una molécula de anticuerpo completa,

que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa; su fragmento, tal como un fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, o Fv; un monómero o un dímero de cadena ligera o de cadena pesada; un anticuerpo monocatenario, es decir, un Fv monocatenario en el que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos mediante un conector peptídico. De forma similar, las regiones variables de cadena pesada y ligera pueden combinarse con otros dominios de anticuerpos según sea apropiado.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 es un fragmento Fab. Preferiblemente, el fragmento Fab tiene una cadena pesada que posee la secuencia indicada como SEQ ID NO:111 del documento WO 01/94585, y una cadena ligera que posee la secuencia indicada como SEQ ID NO:113 del documento WO 01/94585. Las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO:111 y SEQ ID NO:113 del documento WO 01/94585 están codificadas preferiblemente por las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO:112 del documento WO 01/94585, respectivamente.

Como alternativa, se prefiere que la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 sea un fragmento Fab modificado, en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o indicadora. Los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos restos cisteína a los cuales puede unirse la molécula efectora o indicadora. Este fragmento Fab modificado preferiblemente tiene una cadena pesada que posee la secuencia indicada como SEQ ID NO:115 del documento WO 01/94585, y la cadena ligera que tiene la secuencia indicada como SEQ ID NO:113 del documento WO 01/94585. La secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:115 del documento WO 01/94585 está codificada preferiblemente por la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:114 del documento WO 01/94585.

Un grupo efector preferido del documento WO 01/94585 es una molécula polimérica, que puede estar unida al fragmento Fab modificado para aumentar su semivida *in vivo*.

La molécula polimérica puede ser, en general, un polímero natural o sintético, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo- o heteropolisacárido.

Los sustituyentes opcionales concretos, que pueden estar presentes sobre los polímeros sintéticos mencionados anteriormente, incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol y poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o sus derivados, en especial polietilenglicol opcionalmente sustituido, tal como metoxipolietilenglicol o sus derivados. Los polímeros naturales concretos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o sus derivados. "Derivados", tal como se emplea en la presente, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol, tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto como grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 a 40000 Da, y más preferiblemente de 25000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basándose en el uso previsto del producto. Así, por ejemplo, cuando esté previsto que el producto abandone la circulación y penetre en los tejidos, por ejemplo para su uso para el tratamiento de un tumor, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de peso molecular bajo, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de peso molecular mayor, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 25000 a 40000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como polietilenglicol o, en especial, un metoxipolietilenglicol o su derivado, y en especial con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 25000 Da a aproximadamente 40000 Da.

Cada molécula polimérica unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar unida covalentemente al átomo de azufre de un resto cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente será en general un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

Cuando se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener una o más moléculas efectoras o indicadoras unidas a él. Las moléculas efectoras o indicadoras pueden estar unidas al fragmento de anticuerpo a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos disponible o al grupo funcional aminoácido terminal localizado en el fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, hidroxilo o 5 carboxilo libres.

Puede utilizarse un polímero activado como material de partida para la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros, tal como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol, tal como un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinil sulfona, o un disulfuro. Estos materiales de partida pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, en Shearwater Polymers Inc., Hunstville, AL, EEUU) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado utilizando procedimientos químicos convencionales.

Con respecto a los restos polietilenglicol (PEG) unidos, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington D.C.; y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o indicadora, esto puede realizarse mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales, en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o a través de un agente acoplante a la molécula efectora o indicadora antes o después de la reacción con el polímero activado, según sea apropiado. Los procedimientos químicos concretos incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/62331, WO 92/22583, WO 90/00195 y WO 89/01476. Como alternativa, cuando la molécula efectora o indicadora es una proteína o un polipéptido, la unión puede lograrse utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP-A-392.745.

Preferiblemente, el fragmento Fab modificado del documento WO 01/94585 está PEGilado (es decir, tiene PEG (polietilenglicol) unido covalentemente a él) según el método descrito en el documento EP-A-948.544. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 es un fragmento Fab modificado PEGilado tal como se muestra en la figura 13 del documento WO 01/94585. Tal como se muestra en la figura 13 del documento WO 01/94585, el fragmento Fab modificado tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto lisina está unido covalentemente al grupo maleimida. A cada uno de los grupos amina sobre el resto lisina se une un polímero de metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total de la molécula efectora completa, por tanto, es de aproximadamente 40.000 Da. Estos PEG unidos a lisina se denominan "PEG ramificados" o "U-PEG", según se describe en los documentos US 6.113.906; US 5.919.455; US 5.643.575; y US 5.932.462.

Preferiblemente, en el compuesto mostrado en la figura 13 del documento WO 01/94585, la cadena pesada de la parte del anticuerpo tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:115 del documento WO 01/94585, y la cadena ligera tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:113 del documento WO 01/94585. Este compuesto se denomina CDP870 en el documento WO 01/94585.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que puedan ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, pueden utilizarse los dominios de la región constante de la IgG humana, en especial de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando la molécula de anticuerpo está prevista para usos terapéuticos y se requieran las funciones efectoras del anticuerpo. Como alternativa, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden utilizarse cuando la molécula de anticuerpo está prevista para fines terapéuticos y no se requieran las funciones efectoras del anticuerpo, por ejemplo, para simplemente bloquear la actividad del TNF α .

Además, la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 puede tener una molécula efectora o indicadora unida a ella. Por ejemplo, puede tener un macrociclo, para quelar un átomo de metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unidos mediante una estructura de puente covalente. Como alternativa, pueden utilizarse procedimientos de la tecnología del ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (dominios CH2, CH3 y bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa se ha reemplazado o se han reemplazado, o tiene unida a ella, mediante un enlace peptídico, una proteína funcional que no es una inmunoglobulina, tal como una enzima o una molécula de toxina.

La molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 preferiblemente tiene una afinidad de unión de al menos $0,85 \times 10^{-10}$ M, más preferiblemente al menos $0,75 \times 10^{-10}$ M, y lo más preferiblemente $0,5 \times 10^{-10}$ M. Merece advertirse que la molécula de anticuerpo humanizado preferida del documento WO 01/94585, tal como se describe a continuación, tiene una afinidad de aproximadamente $0,5 \times 10^{-10}$ M, que es mejor que la afinidad del anticuerpo monoclonal murino a partir del cual se deriva. El anticuerpo murino tiene una afinidad de aproximadamente $0,85 \times 10^{-10}$ M.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 comprende el dominio variable de cadena ligera hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8 del documento WO 01/94585) y el dominio variable de cadena pesada gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11 del documento WO 01/94585). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas ligera y pesada se muestran en las figuras 8 y 11 del documento WO 01/94585, respectivamente.

El documento WO 01/94585 también se refiere a variantes de la molécula de anticuerpo, que tienen una mejor afinidad por el TNF α . Estos variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración de afinidad, que incluyen mutar las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), el reordenamiento de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), el reordenamiento del ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la presentación de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996), y la PCR sexual (Crameri *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). En Vaughan *et al.* (*supra*) se analizan estos métodos de maduración de afinidad.

El documento WO 01/94585 también proporciona una secuencia de ADN que codifica la cadena o cadenas pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo.

5 El documento WO 01/94585 también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN. Preferiblemente, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo.

10 El documento WO 01/94585 también se refiere a sistemas de célula hospedante/vector utilizados para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo de *E. coli*, y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, y en especial fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo Fv monocatenarios. Pueden utilizarse sistemas de expresión de células hospedantes eucariotas, por ejemplo de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpos más grandes, incluyendo moléculas de anticuerpos completos. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

15 El documento WO 01/94585 también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo, que comprende cultivar una célula hospedante que comprende un vector bajo condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteínas a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo, y aislar la molécula de anticuerpo.

20 Preferiblemente, el proceso para la producción de la molécula de anticuerpo del documento WO 01/94585 comprende cultivar *E. coli* que comprende un vector de expresión de *E. coli* que comprende la secuencia de ADN bajo condiciones adecuadas para conducir a la expresión de una proteína a partir de la secuencia de ADN, y aislar la molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo puede segregarse desde la célula o puede ser dirigida al periplasma mediante secuencias señal apropiadas. Como alternativa, las moléculas de anticuerpos pueden acumularse dentro del citoplasma celular. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se dirige al periplasma. Dependiendo de la molécula de anticuerpo que se está produciendo y del proceso utilizado, resulta deseable permitir que la molécula de anticuerpo se vuelva a plegar y adopte una conformación funcional. Los procedimientos para permitir que las moléculas de anticuerpos se vuelvan a plegar son muy conocidos por los expertos en la técnica.

30 La molécula de anticuerpo puede comprender sólo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso sólo es necesario utilizar una secuencia codificadora del polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar a las células hospedantes. Para la producción de productos que comprendan cadenas pesadas y ligeras, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera, y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, puede utilizarse un único vector, incluyendo dicho vector las secuencias que codifican los polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera.

35 La presente invención describe un isómero de CP870 que tiene un PEG sobre Cys 214 de la cadena ligera (CDP870-PEG-1214). La forma predominante del anticuerpo de CDP870 tiene un enlace disulfuro entre Cys 214 de la cadena ligera y Cys 221 de la cadena pesada, y una unión de PEG en Cys 227 de la cadena pesada. Se identificó un isómero posicional de PEG inesperado en CDP870, que contiene un PEG en Cys 214 de la cadena ligera.

La presente invención describe un isómero de CP870 que tiene un PEG sobre Cys 214 de la cadena ligera, y un enlace disulfuro entre Cys 221 de la cadena pesada y Cys 227 de la cadena pesada.

40 La presente descripción se refiere a un isómero de CP870 que tiene un PEG sobre Cys 214 de la cadena ligera, y un aducto en Cys 221 de la cadena pesada y Cys 227 de la cadena pesada. En una realización preferida, los aductos son glutatión o glutationes, o MEA.

45 Otra realización de la presente descripción es una composición que comprende un isómero posicional de PEG de CDP870, que tiene un PEG unido en Cys 214 de la cadena ligera (CDP870-PEG-1214). La composición terapéutica o de diagnóstico puede venir acompañada de otros ingredientes activos, incluyendo otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo anticuerpos anti-células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos, tales como xantinas.

Otra realización de la composición de la presente descripción comprende además un isómero de disulfuro de CDP870, que contiene un enlace disulfuro entre Cys 214 de la cadena ligera y Cys 227 de la cadena pesada (1214/h227). Preferiblemente, el isómero de disulfuro de CDP870 (1214/h227) tiene un PEG unido en Cys 221 de la cadena pesada.

50 Las composiciones farmacéuticas deben comprender preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se emplea en la presente, se refiere a una cantidad de un agente terapéutica necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o trastorno diana, o para mostrar un efecto preventivo o terapéutico detectable. Para cualquier anticuerpo, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede utilizarse para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Esta información entonces puede utilizarse para determinar las dosis y las vías de administración útiles en seres humanos.

- La cantidad eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede ser determinada mediante la experimentación habitual y está dentro del criterio del médico. En general, una dosis eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, y más preferiblemente de aproximadamente 15 mg/kg. Tal como se muestra en los ejemplos a continuación, se han utilizado unas dosis de 1, 5 y 20 mg/kg para tratar pacientes que padecen artritis reumatoide.
- Las composiciones pueden administrarse de manera individual a un paciente, o pueden administrarse en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.
- La dosis en que la molécula de anticuerpo de la presente invención se administra depende de la naturaleza del trastorno que se va a tratar, del grado en que se encuentra el nivel de TNF α que se va a neutralizar, o en que se espera que sea, por encima de un nivel deseable, y si la molécula de anticuerpo se está utilizando de modo profiláctico o para tratar un trastorno existente.
- Así, por ejemplo, cuando el producto es para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad inflamatoria crónica, tal como la artritis reumatoide, las dosis adecuadas de la molécula de anticuerpo de la presente invención están en el intervalo entre 0,5 y 50 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 20 mg/kg, y lo más preferiblemente de aproximadamente 15 mg/kg. La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto.
- Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas), puede ser necesario administrar una o más dosis diarias. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días) puede que sólo sea necesario administrar una dosificación diaria, semanal o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.
- Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El vehículo no debe inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas víricas inactivas.
- Pueden utilizarse las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo las sales de ácidos minerales, tales como las sales clorhidrato, bromhidrato, fosfato y sulfato, o las sales de ácidos orgánicos, tales como las sales acetato, propionato, malonato y benzoato.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas también pueden contener líquidos, tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. Además, en estas composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, o sustancias tamponantes del pH. Estos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas puedan formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y suspensiones espesas, para la ingestión por el paciente.
- Las formas de administración preferidas incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante una inyección en embolada o una infusión continua. Cuando el producto es para la inyección o la infusión, puede tomar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso, y puede contener agentes formulatorios, tales como agentes suspensores, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.
- Cuando están formuladas, las composiciones de la presente descripción pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones estén adaptadas para la administración a sujetos humanos.
- Las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden administrarse mediante cualquiera de una serie de vías que incluyen, pero no se limitan a la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden utilizarse hipopulverizados para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. En general, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, en forma de disoluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.
- La administración directa de las composiciones normalmente se realiza mediante una inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se transportan hasta el espacio intersticial de un tejido. La composición también puede administrarse a una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, es susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición se va a administrar mediante una vía que emplee el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan al anticuerpo frente a la degradación, pero que liberen el anticuerpo tras haber sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

- 5 Un análisis en profundidad de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, NJ, 1991).

La presente descripción también proporciona la molécula de anticuerpo o las composiciones de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TNF α .

- 10 La presente descripción proporciona también el uso de la molécula de anticuerpo o de la composición según la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por TNF α .

La molécula de anticuerpo o la composición de la presente invención puede utilizarse en cualquier terapia en la que se desee reducir el nivel de TNF α biológicamente activo presente en el cuerpo humano o animal. El TNF α puede estar circulando en el cuerpo o estar presente a un nivel indeseablemente alto en un sitio concreto del cuerpo.

- 15 Por ejemplo, unos niveles elevados de TNF α están implicados en trastornos inmunológicos e inmunoregulatorios agudos y crónicos, infecciones, que incluyen el choque séptico, endotóxico y cardiovascular, trastornos inflamatorios, trastornos neurodegenerativos, enfermedades malignas y hepatitis inducida por alcohol. Los detalles de los numerosos trastornos asociados con unos niveles elevados de TNF α se indican en el documento US 5.919.452. La molécula de anticuerpo o la composición de la presente invención pueden utilizarse en la terapia de enfermedades mediadas por TNF α . Las enfermedades particularmente pertinentes que pueden ser tratadas con la molécula de anticuerpo de la presente invención incluyen sepsis, insuficiencia cardíaca congestiva, choque séptico o endotóxico, caquexia, síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos, SIDA, alergias, psoriasis, TB, trastornos óseos inflamatorios, trastornos de coagulación de la sangre, quemaduras, episodios de rechazo tras un trasplante de órganos o de tejidos, enfermedad de Crohn y enfermedades autoinmunitarias, tales como tiroiditis y artritis reumatoide y osteoartritis.

Además, la molécula de anticuerpo o la composición puede utilizarse para reducir los efectos secundarios asociados con la generación de TNF α durante una terapia neoplásica, para eliminar o reducir los síntomas relacionados con el choque asociados con el tratamiento o la prevención del rechazo de injertos mediante el uso de un anticuerpo antilinfocitos, o para tratar la insuficiencia de múltiples órganos.

- 30 La molécula de anticuerpo o la composición de la presente descripción se emplea preferiblemente para el tratamiento de la artritis reumatoide o de la osteoartritis.

La presente descripción también proporciona una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo descrita en la presente para su uso para tratar sujetos humanos o animales que padecen o que están en riesgo de padecer un trastorno mediado por TNF α .

- 35 La molécula de anticuerpo o la composición de la presente descripción también puede utilizarse para el diagnóstico, por ejemplo el diagnóstico *in vivo* y la formación de imágenes de estados de enfermedad que implican unos niveles elevados de TNF α .

- 40 La presente invención se describe más a fondo sólo como ilustración en los siguiente ejemplos, que hacen referencia a las figuras adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con fines de ejemplificación y no pretenden limitar el alcance de la invención, que se ha descrito en términos amplios anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1

- Se fabrica un isómero posicional de PEG de CDP870, en el que la PEG maleimida ramificada se conjuga al resto Cys 214 de la cadena ligera, en lugar de la Cys 227 diana de la cadena pesada. Este material se identificó mediante el análisis de (1) los fragmentos de PEG-péptido separados mediante HPLC y analizados mediante secuenciación N-terminal, y (2) la identificación de la cadena pesada no pegilada y de la cadena ligera pegilada en extractos procedentes de una electroforesis en gel de SDS-PAGE reductora. Otras técnicas, tales como HPLC de exclusión molecular desnaturizante, han corroborado estos resultados. La reducción de las muestras para producir una cadena pesada no pegilada es la prueba de que la asociación de cadena pesada/ligera en el isómero posicional de PEG es debida a fuerzas no covalentes distintas de un enlace disulfuro.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Celltech R&D Limited
 <120> Isómeros posicionales de PEG de un anticuerpo, composiciones que los comprenden, y su uso
 <130> P037675EP
 <140> 03731385.5
 <141> 28-05-2003
 <150> US 60/383765
 <151> 28-05-2002
 <150> PCT/US03/08608
 <151> 20-03-2003
 <160> 2
 <170> SeqWin99, versión 1.02
 <210> 1
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de isómero posicional de PEG
 <400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

ES 2 370 710 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 2

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de isómero posicional de PEG

<400> 2

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

ES 2 370 710 T3

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Ala Ala
225

REIVINDICACIONES

1.- Una molécula de anticuerpo aislada que es un fragmento Fab modificado, cuyas secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO:1) y de la cadena pesada (SEQ ID NO:2) son como se indica en la figura 2, en la que un resto polietilenglicol (PEG) está unido a Cys 214 de la cadena ligera.

5 2.- La molécula de anticuerpo aislada de la reivindicación 1, que comprende además un enlace disulfuro entre Cys 221 y Cys 227 de la cadena pesada.

3.- Una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de anticuerpo aislada de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

FIG 1

Cadena ligera
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPKGKAPKALIVS
 ASFLYSGVPIYRFSGSGIDFILISSLPQEDFATYYCQQYNIYPLIFGQ
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO:1

Cadena pesada
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTDYGMMNWRQAPGKGLEWMMGW
 INTYICEPIYADSVKGRFTISLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGY
 RSYAMDYWGQGILVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGIQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCAA SEQ ID NO:2

PEG

FIG 2

Cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVQDR VTITKASQNVGIVVAWYQQKPKAPKALII
 SASFLYSGVPIYRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNITYPLTFG
 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNRFYFREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLSITLTLTKADYEKHKVYACEVTHQ
 214
 GLSSPVTKSFRGEC SEQ ID NO:1

|
 PEG

Cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGGLEMMGWI
 K
 NTYIGEPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYR
 SYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGRPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
 221 227
 NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCAA SEQ ID NO:2