

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 679**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/24	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2001 E 10184630 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2330129**

54 Título: **Anticuerpos anti-TNF, composiciones, métodos y usos**

30 Prioridad:

07.08.2000 US 223360 P
29.09.2000 US 236826 P
01.08.2001 US 920137

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2017

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

GILES-KOMAR, JILL;
KNIGHT, DAVID M.;
HEAVNER, GEORGE;
SCALLON, BERNARD y
SHEALY, DAVID

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 607 679 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).

Anticuerpos anti-TNF, composiciones, métodos y usos**Descripción**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos específicos para proteína factor de necrosis tumoral alfa (TNF).

TÉCNICA RELACIONADA

10 El TNF alfa es un homotrímero de subunidades de proteína de 17 kD soluble (Smith *et al.*, J. Biol. Chem. 262: 6951-6954 (1987)). También existe una forma precursora de TNF de 26 kD unida a membrana (Kriegler *et al.*, Cell 53: 45-53 (1988)). Para revisiones acerca de TNF, véase Beutler *et al.*, Nature 320: 584 (1986); Old, Science 230: 630 (1986) y Le *et al.*, Lab. Invest. 56: 234 (1987).

15 Células diferentes a monocitos o macrófagos también producen TNF alfa. Por ejemplo, líneas de células tumorales no monocíticas humanas producen TNF alfa (Rubin *et al.*, J. Exp. Med. 164: 1350 (1986); Spriggs *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 84: 6563 (1987)). Los linfocitos T de sangre periférica CD4+ y CD8+ y algunas líneas de células T y B cultivadas (Cuturi *et al.*, J. Exp. Med. 165: 1581 (1987); Sung *et al.*, J. Exp. Med. 168: 1539 (1988), Turner *et al.*, Eur. J. Immunol. 17: 1807-1814 (1987)) también producen TNF alfa.

20 TNF alfa provoca acciones pro-inflamatorias que dan como resultado lesión tisular, tal como degradación de cartílago y huesos (Saklatvala, Nature 322: 547-549 (1986); Bertolini, Nature 319: 516-518 (1986)), inducción de moléculas de adhesión, inducción de actividad pro-coagulante en células del endotelio vascular (Poher *et al.*, J. Immunol. 136: 1680 (1986)), aumento de la adherencia de neutrófilos y linfocitos (Poher *et al.*, J. Immunol. 138: 3319 (1987)) y estimulación de la liberación de factor activador de plaquetas a partir de macrófagos, neutrófilos y células endoteliales vasculares (Camussi *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1390 (1987)).

25 La evidencia reciente asocia el TNF alfa con infecciones (Cerami *et al.*, Immunol. Today 9: 28 (1988)), trastornos inmunes, patologías neoplásicas (Oloff *et al.*, Cell 50: 555 (1987)), patologías autoinmunes y patologías de injerto frente a hospedador (Piguet *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1280 (1987)). La relación de TNF alfa con cáncer y patologías infecciosas con frecuencia está relacionada con el estado catabólico del hospedador. Los pacientes con cáncer sufren de pérdida de peso, habitualmente asociada con anorexia.

30 El debilitamiento considerable que está asociado con cáncer y otras enfermedades, se conoce como "caquexia" (Kern y al. J. Parent. Enter. Nutr. 12: 286-298 (1988)). La caquexia incluye pérdida de peso progresiva, anorexia y erosión persistente de masa corporal magra como respuesta a un crecimiento maligno. El estado caquético provoca gran parte de morbilidad y mortalidad en cáncer. Existe evidencia de que TNF alfa está implicado en caquexia en cáncer, patología infecciosa y otros estados catabólicos (por ejemplo, véase Beutler y Cerami, Ann. Rev. Immunol. 7: 625-655 (1989)).

35 Se cree que el TNF alfa juega un papel central en sepsis por gram negativos y choque endotóxico (Michie *et al.*, Br. J. Surg. 76: 670-671 (1989); Debets *et al.*, Second Vienna Shock Forum, págs. 463-466 (1989), Simpson *et al.*, Crit. Care Clin. 5: 27-47 (1989)), incluyendo fiebre, malestar, anorexia y caquexia. La endotoxina activa de forma marcada la producción y secreción de monocitos/macrófagos de TNF alfa y otras citoquinas (Kornbluth *et al.*, J. Immunol. 137: 2585-2591 (1986)). TNF alfa y otras citoquinas derivadas de monocitos median las respuestas metabólicas y neurohormonales a endotoxina (Michie *et al.*, New Engl. J. Med. 318: 1481-1486 (1988)). La administración de endotoxina a voluntarios humanos produce enfermedad aguda con síntomas similares a la gripe incluyendo fiebre, taquicardia, tasa metabólica aumentada y liberación de hormona del estrés (Revhaug *et al.*, Arch. Surg. 123: 162-170 (1988)). El TNF alfa circulante aumenta en pacientes que sufren de sepsis por gram negativos (Waage *et al.*, Lancet 1: 355-357 (1987); Hammerle *et al.*, Second Vienna Shock Forum, págs. 715-718 (1989); Debets *et al.*, Crit. Care. Med 17: 489-497 (1989); Calandra *et al.*, J. Infect. Dis. 161: 982-987 (1990)).

40 Por tanto, TNF alfa ha estado implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, bacterianas y parasitarias, malignidades y/o enfermedades neurodegenerativas y es una diana útil para terapia biológica específica en enfermedades, tales como artritis reumatoide y enfermedad de Crohn. Los efectos beneficiosos en experimentos de etiqueta descubierta con un anticuerpo monoclonal quimérico para TNF alfa (cA2) se han presentado con supresión de inflamación y con tratamiento satisfactorio después de recaída en artritis reumatoide (Elliott *et al.*, Arthritis Rheum. 36: 1681-1690 (1993) y Elliott *et al.*, Lancet 344: 1125-1127 (1994)) y en la enfermedad de Crohn (Van Dullemen *et al.*, Gastroenterology 109: 129-135 (1995)). También se han presentado los resultados beneficiosos en un experimento aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo con cA2 en artritis reumatoide con supresión de inflamación (Elliott *et al.*, Lancet 344: 1105-1110 (1994)). Los anticuerpos para un material "modulador" que se caracterizó como caquectina (que posteriormente se encontró que era idéntico a TNF) se han descrito por Cerami *et al.*, (Publicación de Patente EPO 0212489, 4 de marzo de 1987). Se ha dicho que tales anticuerpos son útiles en inmunoensayos de diagnóstico y en terapia de choque en infecciones bacterianas. Rubin *et al.*, (Publicación de Patente EPO 0218868, 22 de abril de 1987) describieron

anticuerpos monoclonales para TNF humano, los hibridomas que secretan tales anticuerpos, métodos para producir tales anticuerpos y el uso de tales anticuerpos en inmunoensayo de TNF. Yone *et al.*, (Publicación de Patente EPO 0288088, 26 de octubre de 1988) describieron anticuerpos anti-TNF, incluyendo mAb y su utilidad en el diagnóstico con inmunoensayo de patologías, en particular patología de Kawasaki e infección bacteriana. Los líquidos corporales de pacientes con patología de Kawasaki (síndrome de nódulo linfático mucocutáneo febril agudo infantil; Kawasaki, T., *Allergy* 16: 178 (1967), Kawasaki, T., *Shonica (Pediatrics)* 26: 935 (1985)) se ha dicho que contienen niveles de TNF elevados que estaban relacionados con el progreso de la patología (Yone *et al.*, mencionado anteriormente).

Otros investigadores han descrito mAb específicos para TNF humano recombinante que tenían actividad neutralizante *in vitro* (Liang, C. M. *et al.*, (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137: 847-854 (1986); Meager, A. *et al.*, *Hybridoma* 6: 305-311 (1987); Fendly *et al.*, *Hybridoma* 6: 359-369 (1987); Bringman, T. S. *et al.*, *Hybridoma* 6: 489-507 (1987); Hirai, M. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96: 57-62 (1987); Moller, A. *et al.*, (*Cytokine* 2: 162-169 (1990)). Algunos de estos mAb se usaron para cartografiar epítopos de TNF humano y desarrollar inmunoensayos enzimáticos (Fendly *et al.*, mencionado anteriormente; Hirai *et al.*, mencionado anteriormente; Moller *et al.*, mencionado anteriormente) y para ayudar en la purificación de TNF recombinante (Bringman *et al.*, mencionado anteriormente). Sin embargo, estos estudios no proporcionan una base para producir anticuerpos neutralizantes de TNF que se pueden usar para usos de diagnóstico o terapéutico *in vivo* en seres humanos, debido a inmunogenicidad, carencia de especificidad y/o idoneidad farmacéutica.

Los antiseros o mAb neutralizantes para TNF han demostrado en mamíferos diferentes al hombre que anulan los cambios fisiológicos adversos y evitan la muerte después de exposición mortal en endotoxemia experimental y bacteriemia. Este efecto se ha demostrado, por ejemplo, en ensayos de mortalidad de roedores y en sistemas de modelo de patología de primate (Mathison, J C *et al.*, *J. Clin. Invest.* 81: 1925-1937 (1988); Beutler, B. *et al.*, *Science* 229: 869-871 (1985); Tracey, K J, *et al.*, *Nature* 330: 662-664 (1987); Shimamoto, Y. *et al.*, *Immunol. Lett.* 17: 311-318 (1988) Silva, A. T., *et al.*, *J. Infect. Dis.* 162: 421-427 (1990), Opal, S. M., *et al.*, *J. Infect. Dis.* 161: 1148-1152 (1990); Hinshaw, L. B., *et al.*, *Circ. Shock* 30: 279-292 (1990)).

Los loci de unión al supuesto receptor de hTNF se han descrito por Eck y Sprang (*J. Biol. Chem.* 264 (29), 17595-17605 (1989)), que identificaron los loci de unión a receptor de TNF- α que consistían en los aminoácidos 11-13, 37-42, 49-57 y 155-157. La Solicitud PCT W091/02078 (fecha de prioridad del 7 de agosto de 1989) describe ligandos de TNF que se pueden unir a anticuerpos monoclonales que tienen los siguientes epítopos: al menos uno de 1-20, 56-77 y 108-127; al menos dos de 1-20, 56-77, 108-127 y 138-149; todos de 1-18, 58-65; 115-125 y 138-149; todos de 1-18 y 108-128; todos de 56-79, 110-127 y 135 ó 136-155; todos de 1-30, 117-128 y 141-153; todos de 1-26, 117-128 y 141-153; todos de 22-40, 49-96 ó 97, 110-127 y 136-153; todos de 12-22, 36-45, 96-105 y 132-157; todos de tanto 1-20 como 76-90; todos de 22-40, 69-97, 105-128 y 135-155; todos de 22-31 y 146-157; todos de 22-40 y 49-98; al menos uno de 22-40, 49-98 y 69-97, ambos de 22-40 y 70-87. El documento WO 97/291131 describe anticuerpos humanos que se unen a TNF α humano. Se cree que los anticuerpos tienen una afinidad alta por TNF α humano (K_d de 10^{-8} M o menos); una velocidad de disociación lenta para disociación de TNF α humano (K_{off} de 10^{-3} s $^{-1}$ o menos) y que son capaces de neutralizar la actividad de TNF α humano *in vitro* e *in vivo*.

Los anticuerpos de mamífero no humano, quiméricos, policlonales (por ejemplo, antiseros) y/o monoclonales (mAb) y fragmentos (por ejemplo, productos de digestión proteolítica o de fusión de proteína de los mismos) son agentes terapéuticos potenciales que se están investigando en algunos casos para intentar tratar determinadas enfermedades. Sin embargo, tales anticuerpos o fragmentos pueden provocar una respuesta inmune cuando se administran a seres humanos. Una respuesta inmune de este tipo puede dar como resultado una eliminación mediada por complejo inmune de los anticuerpos o fragmentos de la circulación y hacer que la administración repetida sea inadecuada para terapia, reduciendo de ese modo el beneficio terapéutico para el paciente y limitando la readministración del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la administración repetida de anticuerpos o fragmentos que comprenden partes no humanas puede conducir a enfermedad del suero y/o anafilaxis. Para evitar estos y otros problemas, se han tomado varios enfoques para reducir la inmunogenicidad de tales anticuerpos y partes de los mismos, incluyendo quimerización y humanización, como se conoce bien en la técnica. Sin embargo, estos y otros enfoques aún pueden dar como resultado anticuerpos o fragmentos que tengan alguna inmunogenicidad, afinidad baja, avidéz baja o con problemas en cultivo celular, aumento de escala, producción y/o rendimientos bajos. Por tanto, tales anticuerpos o fragmentos pueden ser menos que adecuados de forma ideal para preparación o uso como proteínas terapéuticas.

Por consiguiente, existe una necesidad de proporcionar anticuerpos anti-TNF o fragmentos que superen uno más de estos problemas, así como mejoras sobre anticuerpos conocidos o fragmentos de los mismos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos anti-TNF aislados humanos, composiciones de anticuerpos anti-TNF, ácidos nucleicos codificantes, vectores, células huésped, composiciones y usos de los mismos, como se ha descrito y posibilitado en este documento, en combinación con lo que se conoce en la técnica.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno del mismo que tiene tres CDRs de la cadena pesada y tres CDRs de la cadena ligera, en donde las tres CDRs de la cadena pesada tienen la secuencia de aminoácidos de:

5 CDRH1:SYAMH;
 CDRH2: FMSYDGSNKKYADSVKG;
 CDRH3: DRGIAAGGNYYYYGMDV; y
 las tres CDRs de la cadena ligera tienen la secuencia de aminoácidos de:

10 CDRL1: RASQSVVSYLA;
 CDRL2: DASNRAT;
 CDRL3: QQRSNWPPFT;

15 para su uso en el tratamiento de colitis ulcerosa.

La invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde la composición es para el tratamiento de la colitis ulcerosa.

20 La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden, que son complementarias o que hibridan a un polinucleótido que codifica anticuerpos anti-TNF específicos que comprenden al menos una secuencia especificada, dominio, parte o variante de la misma. La presente memoria descriptiva describe además vectores recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico de anticuerpo anti-TNF, células huésped que contienen tales ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos para
 25 preparar y/o usar tales ácidos nucleicos de anticuerpo, vectores y/o células huésped.

Al menos un anticuerpo de la invención se une a al menos un epítipo especificado específico para al menos una proteína de TNF, subunidad, fragmento, parte o cualquier combinación de los mismos. El al menos un epítipo puede comprender al menos una región de unión a anticuerpo que comprende al menos una parte de dicha
 30 proteína, epítipo que preferiblemente está comprendido de al menos 1-5 aminoácidos de al menos una parte del mismo, tal como pero sin limitación, al menos un dominio funcional, extracelular, soluble, hidrófilo, externo o citoplasmático de dicha proteína o cualquier parte del mismo.

La presente invención también proporciona la menos un anticuerpo anti-TNF aislado como se ha descrito en este documento, donde el anticuerpo tiene al menos una actividad, tal como, pero sin limitación inhibición de moléculas de adhesión celular inducida por TNF, inhibición de unión de TNF a receptor, mejora del Índice Artrítico en un modelo de ratón, (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 3-7). Por tanto, un anticuerpo anti-TNF se puede seleccionar para una actividad correspondiente de acuerdo con métodos conocidos, tales como pero sin limitación, al menos una
 35 actividad biológica hacia una proteína de TNF.

La presente memoria descriptiva también describe al menos un método para expresar al menos un anticuerpo anti-TNF, en una célula huésped, que comprende cultivar una célula huésped como se ha descrito en este documento en condiciones en las que al menos un anticuerpo anti-TNF se expresa en cantidades detectables y/o recuperables.
 40

La presente memoria descriptiva también describe al menos una composición que comprende (a) un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TNF y/o anticuerpo como se ha descrito en este documento y (b) un vehículo o diluyente adecuado. El vehículo o diluyente puede ser opcionalmente farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con vehículos o diluyentes conocidos. Opcionalmente, la composición puede comprender además al menos un compuesto, proteína o composición adicional.
 45
 50

La presente memoria descriptiva describe además al menos un método o composición de anticuerpo anti-TNF, para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz para modular o tratar al menos una afección relacionada con TNF en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes de, posterior a o durante una afección relacionada, como se conoce en la técnica y/o se ha descrito en este documento.
 55

La presente memoria descriptiva también describe al menos una composición, dispositivo y/o método de administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-TNF, de acuerdo con la presente invención.
 60

La presente memoria descriptiva describe además al menos un método o composición de anticuerpo anti-TNF, para diagnosticar al menos una afección relacionada con TNF en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes de, posterior a o durante una afección relacionada, como se conoce en la técnica y/o se ha descrito en este documento.
 65

La presente memoria descriptiva también describe al menos una composición, dispositivo y/o método de administración para el diagnóstico de al menos un anticuerpo anti-TNF, de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La **Figura 1** muestra una representación gráfica que muestra un ensayo para capacidad de mAb de TNV en sobrenadantes de células de hibridoma para inhibir unión de TNF α a receptor de TNF recombinante. Cantidades variables de sobrenadantes de células de hibridoma que contienen cantidades conocidas de mAb de TNV se preincubaron con una concentración fija (5 ng/ml) de TNF α marcado con ¹²⁵I. La mezcla se transfirió a Optiplates de 96 pocillos que previamente se habían recubierto con p55-sf2, una proteína de fusión recombinante de receptor de TNF/IgG. La cantidad de TNF α que se unió al receptor p55 en presencia de los mAb se determinó después de lavar el material no unido y el recuento usando un contador gamma. Aunque en estos experimentos se ensayaron ocho muestras de mAb de TNV, por simplicidad no se muestran en este documento tres de los mAb que se demostró mediante análisis de secuencia de ADN que eran idénticos a uno de los otros mAb de TNV (véase la sección 5.2.2). Cada muestra se ensayó por duplicado. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

20 La **Figura 2** muestra secuencias de ADN de las regiones variables de cadena pesada de mAb de TNV. El gen de línea germinal mostrado es el gen DP-46. "TNV" indica que la secuencia mostrada es la secuencia de de TNV14, TNV15, TNV148 y TNV196. Los primeros tres nucleótidos en la secuencia de TNV definen el codón Met de inicio de traducción. Los puntos en las secuencias de genes de mAb de TNV indican que el nucleótido es el mismo que en la secuencia de línea germinal. Los primeros 19 nucleótidos (subrayados) de las secuencias de TNV corresponden al oligonucleótido usado para amplificar por PCR la región variable. Una traducción de aminoácido (abreviaturas de letra única) que comienza con el mAb maduro se muestra sólo para el gen de línea germinal. Los tres dominios de CDR en la traducción de aminoácido de línea germinal están marcados en negritas y subrayados. Las líneas marcadas TNV148(B) indican que la secuencia mostrada se refiere tanto a TNV148 como TNV148B. Los huecos en la secuencia de ADN de línea germinal (CDR3) se deben a que la secuencia no se conoce o que no existe en el gen de línea germinal. Las cadenas pesadas de mAb de TNV usan la región de unión J6.

30 La **Figura 3** muestra secuencias de ADN de las regiones variables de cadena ligera de mAb de TNV. El gen de línea germinal mostrado es un miembro representativo de la familia de Vg/38K de genes de región variable de línea germinal kappa humanos. Los puntos en las secuencias de genes de mAb de TNV indican que el nucleótido es el mismo que en la secuencia de línea germinal. Los primeros 16 nucleótidos (subrayados) de las secuencias de TNV corresponden al oligonucleótido usado para amplificar por PCR la región variable. Una traducción de aminoácidos del mAb maduro (abreviaturas de letras únicas) se muestra sólo para el gen de línea germinal. Los tres dominios de CDR en la traducción de aminoácidos de línea germinal están marcados en negritas y subrayados. Las líneas marcadas TNV148(B) indican que la secuencia mostrada se refiere tanto a TNV148 como a TNV148B. Los huecos en la secuencia de ADN de línea germinal (CDR3) se deben a que la secuencia no se conoce o que no existe en el gen de línea germinal. Las cadenas ligeras de mAb de TNV usan la secuencia de unión J3.

45 La **Figura 4** muestra secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones variables de cadena pesada de mAb de TNV. Las secuencias de aminoácidos mostradas (abreviaturas de letra única) se dedujeron a partir de la secuencia de ADN determinada a partir de tanto productos de PCR no clonados como productos de PCR clonados. Las secuencias de aminoácidos se muestran divididas en los dominios de secuencia señal secretora (señal), flanqueante (FW) y de región determinante de complementariedad (CDR). La secuencia de aminoácidos para el gen de línea germinal DP-46 se muestra en la línea superior de cada dominio. Los puntos indican que el aminoácido en el mAb de TNV es idéntico al gen de línea germinal. TNV148(B) indica que la secuencia mostrada se refiere tanto a TNV148 como TNV148B. Los TNV indican que la secuencia mostrada se refiere a todos los mAb de TNV a menos que se muestre una secuencia diferente. Los guiones en la secuencia de línea germinal (CDR3) indican que las secuencias no se conocen o que no existen en el gen de línea germinal.

55 La **Figura 5** muestra secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones variables de cadena ligera de mAb de TNV. Las secuencias de aminoácidos mostradas (abreviaturas de letra única) se dedujeron a partir de secuencia de ADN determinada a partir de tanto productos de PCR no clonados como productos de PCR clonados. Las secuencias de aminoácidos se muestran divididas en los dominios de secuencia señal secretora (señal), flanqueante (FW) y región determinante de complementariedad (CDR). La secuencia de aminoácidos para el gen de línea germinal de cadena ligera de tipo de Vg/38K se muestra en la línea superior de cada dominio. Los puntos indican que el aminoácido en el mAb de TNV es idéntico al gen de línea germinal. TNV148(B) indica que la secuencia mostrada se refiere tanto a TNV como TNV148B. "Todos" indica que la secuencia mostrada se refiere a TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B y TNV186.

65 La **Figura 6** muestra ilustraciones esquemáticas de los plásmidos de expresión de cadena pesada y ligera

5 usados para preparar las células C466 que expresan rTNV148B. p1783 es el plásmido de cadena pesada y p1776 es el plásmido de cadena ligera. Los dominios codificantes de región variable y constante de rTNV148B se muestran como cuadros negros. Los potenciadores de inmunoglobulina en los intrones J-C se muestran como cuadros grises. Se muestran los sitios de restricción pertinentes. Los plásmidos se muestran orientados de forma que la transcripción de los genes de Ab progrese en una dirección en el sentido de las agujas del reloj. El plásmido p1783 tiene 19,53 kb de longitud y el plásmido p1776 tiene 15,06 kb de longitud. Las secuencias de nucleótidos completas de ambos plásmidos se conocen. La secuencia codificante de región variable en p1783 se puede reemplazar fácilmente con otra secuencia de región variable de cadena pesada reemplazando el fragmento de restricción BsiWI/BstBI. La secuencia codificante de región variable en p1776 se puede reemplazar con otra secuencia de región variable reemplazando el fragmento de restricción Sall/AflIII.

15 La **Figura 7** muestra la representación gráfica de análisis de curva de crecimiento de cinco líneas celulares productoras de rTNV148B. Los cultivos se iniciaron el día 0 sembrando las células en matraces T75 en medio I5Q + MHX para tener una densidad celular viable de $1,0 \times 10^5$ células/ml en un volumen de 30 ml. Los cultivos celulares usados para estos estudios habían estado en cultivo continuo desde que se realizaron transfecciones y subclonaciones. En los días posteriores, las células en los matraces T se resuspendieron minuciosamente y se retiró una alícuota de 0,3 ml del cultivo. Los estudios de curva de crecimiento se finalizaron cuando los recuentos celulares cayeron por debajo de $1,5 \times 10^5$ células/ml. El número de células vivas en la alícuota se determinó mediante exclusión con azul de tripano y el resto de la alícuota se almacenó para determinación de concentración de mAb posterior. Se realizó un ELISA para IgG humana en todas las alícuotas de muestra al mismo tiempo.

25 La **Figura 8** muestra una representación gráfica de comparación de índices de crecimiento celular en presencia de concentraciones variables de selección de MHX. Los subclones celulares C466A y C466B se descongelaron en medio sin MHX (IMDM, FBS al 5% y glutamina 2 mM) y se cultivaron durante dos días adicionales. Después ambos cultivos celulares se dividieron en tres cultivos que contenían no MHX, 0,2X MHX o 1X MHX. Un día después, los matraces T75 nuevos se sembraron con los cultivos a una densidad de partida de 1×10^5 células/ml y las células se recontaron en intervalos de 24 horas durante una semana. Los tiempos de duplicación durante los primeros 5 días se calcularon usando la fórmula en SOP PD32.025 y se muestran por encima de las barras.

35 La **Figura 9** muestra representaciones gráficas de la estabilidad de producción de mAb a lo largo del tiempo a partir de dos líneas celulares productoras de rTNV148B. Los subclones celulares que habían estado en cultivo continuo desde que se realizaron transfecciones y subclonaciones se usaron para comenzar cultivos seriados a largo plazo en placas de cultivo de 24 pocillos. Las células se cultivaron en medio I5Q con y sin selección de MHX. Se realizaron pases de las células continuamente separando los cultivos cada 4 a 6 días para mantener nuevos cultivos viables mientras que se dejó que los cultivos previos se agotaran. Las alícuotas del sobrenadante celular agotado se recogieron poco después de que los cultivos se agotaran y se almacenaron hasta que se determinaron las concentraciones de mAb. Se realizó un ELISA para IgG humana en todas las alícuotas de muestra al mismo tiempo.

45 La **Figura 10** muestra cambios de peso en ratones Tg 197 en un modelo de ratón de artritis en respuesta a anticuerpos anti-TNF de la presente invención en comparación con controles en el Ejemplo 4. A aproximadamente 4 semanas de edad los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en el género y peso corporal, a uno de 9 grupos de tratamiento y se trataron con una dosis de bolo intraperitoneal única de PBS de Dulbecco (D-PBS) o un anticuerpo anti-TNF de la presente invención (TNV14, TNV148 o TNV 196) a 1 mg/kg o 10 mg/kg. Cuando los pesos se analizaron como un cambio desde la pre-dosis, los animales tratados con 10 mg/kg de cA2 mostraron ganancia de peso sistemáticamente mayor que los animales tratados con D-PBS a través de todo el estudio. Esta ganancia de peso fue significativa en las semanas 3-7. Los animales tratados con 10 mg/kg de TNV148 también consiguieron ganancia de peso significativa en la semana 7 del estudio.

55 Las **Figuras 11A-C** representan la progresión de la gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico como se presenta en el Ejemplo 4. El índice artrítico del grupo tratado con 10 mg/kg de cA2 fue menor que el grupo de control de D-PBS comenzando en la semana 3 y continuando por todo el resto del estudio (semana 7). Los animales tratados con 1 mg/kg de TNV14 y los animales tratados con 1 mg/kg de cA2 no mostraron reducción significativa en AI después de la semana 3 cuando se compararon con el Grupo tratado con D-PBS. No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento de 10 mg/kg cuando cada uno se comparó con los otros de dosis similares (10 mg/kg de cA2 en comparación con 10 mg/kg de TNV14, 148 y 196). Cuando los grupos de tratamiento de 1 mg/kg se compararon, el 1 mg/kg de TNV148 mostró un AI significativamente menor que 1 mg/kg de cA2 a las semanas 3, 4 y 7. El 1 mg/kg de TNV148 también fue significativamente menor que el grupo tratado con 1 mg/kg de TNV14 a las 3 y 4 semanas. Aunque TNV196 mostró reducción significativa en AI hasta la semana 6 del estudio (cuando se comparó con el Grupo tratado con D-PBS), TNV148 fue el único tratamiento de 1 mg/kg que permaneció significativo a la

finalización del estudio.

5 La **Figura 12** muestra cambios de peso de ratones Tg 197 de un modelo de ratón de artritis en respuesta a anticuerpos anti-TNF de la presente invención en comparación con controles en el Ejemplo 5. Aproximadamente a 4 semanas de edad los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en peso corporal, a uno de 8 grupos de tratamiento y se trataron con una dosis de bolo intraperitoneal de artículo de control (D-PBS) o anticuerpo (TNV14, TNV148) a 3 mg/kg (semana 0). Las inyecciones se repitieron en todos los animales en las semanas 1, 2, 3 y 4. Los grupos 1-6 se evaluaron para ensayar la eficacia del artículo. Las muestras de suero, obtenidas a partir de los animales en los Grupos 7 y 8 se evaluaron para determinar la inducción de respuesta inmune y eliminación farmacocinética de TNV14 o TNV148 en las semanas 2, 3 y 4.

15 Las Figuras **13A-C** son gráficos que representan la progresión de la gravedad de la enfermedad en el Ejemplo 5 basándose en el índice artrítico. El índice artrítico del grupo tratado con 10 mg/kg de cA2 fue significativamente menor que el del grupo de control de D-PBS comenzando en la semana 2 y continuando durante el resto del estudio (semana 5). Los animales tratados con 1 mg/kg o 3 mg/kg de cA2 y los animales tratados con 3 mg/kg de TNV14 no consiguieron ninguna reducción significativa en AI en ningún momento a lo largo de todo el estudio cuando se compararon con el grupo de control de D-PBS. Los animales tratados con 3 mg/kg de TNV148 mostraron una reducción significativa cuando se compararon con el grupo tratado con D-PBS comenzando en la semana 3 y continuando hasta la semana 5. Los animales tratados con 10 mg/kg de cA2 mostraron una reducción significativa en AI cuando se compararon con tanto dosis menores (1 mg/kg y 3 mg/kg) de cA2 en las semanas 4 y 5 del estudio como también fue significativamente menor que los animales tratados con TNV14 en las semanas 3-5. Aunque aparentemente no existen diferencias significativas entre cualquiera de los grupos de tratamiento de 3 mg/kg, el AI para los animales tratados con 3 mg/kg de TNV14 fue significativamente mayor en algunos puntos de tiempo que los de 10 mg/kg, mientras que los animales tratados con TNV148 no fueron significativamente diferentes de los animales tratados con 10 mg/kg de cA2.

30 La **Figura 14** muestra cambios de peso en ratones Tg 197 de un modelo de ratón de artritis en respuesta a anticuerpos anti-TNF de la presente invención en comparación con controles en el Ejemplo 6. Aproximadamente a 4 semanas de edad los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en el género y peso corporal, a uno de 6 grupos de tratamiento y se trataron con una dosis de bolo intraperitoneal única de anticuerpo (cA2 o TNV148) a 3 mg/kg o 5 mg/kg. Este estudio utilizó los Grupos de control de D-PBS y de 10 mg/kg de cA2.

35 La **Figura 15** representa la progresión de la gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico como se presenta en el Ejemplo 6. Todos los grupos de tratamiento mostraron alguna protección en puntos de tiempo tempranos, mostrando el de 5 mg/kg de cA2 y el de 5 mg/kg de TNV148 reducciones significativas en AI en las semanas 1-3 y mostrando todos los grupos de tratamiento una reducción significativa en la semana 2. Posteriormente en el estudio los animales tratados con 5 mg/kg de cA2 mostraron alguna protección, con reducciones significativas en las semanas 4, 6 y 7. La dosis baja (3 mg/kg) tanto de cA2 como de TNV148 mostró reducciones significativas en 6 y todos los grupos de tratamiento mostraron reducciones significativas en la semana 7. Ninguno de los grupos de tratamiento fue capaz de mantener una reducción significativa a la finalización del estudio (semana 8). No hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos de tratamiento (excluyendo el grupo de control de solución salina) en ningún punto del tiempo.

50 La **Figura 16** muestra cambios de peso de ratones Tg 197 de un modelo de ratón de artritis en respuesta a anticuerpos anti-TNF de la presente invención en comparación con los controles en el Ejemplo 7. Para comparar la eficacia de una dosis intraperitoneal única de TNV148 (obtenido de células de hibridoma) y rTNV148B (obtenido de células transfectadas). Aproximadamente a 4 semanas de edad los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en género y peso corporal, a uno de 9 grupos de tratamiento y se trataron con una dosis de bolo intraperitoneal única de PBS de Dulbecco (D-PBS) o anticuerpo (TNV148, rTNV148B) a 1 mg/kg.

55 La **Figura 17** representa la progresión de la gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico como se presenta en el Ejemplo 7. El índice artrítico del grupo tratado con 10 mg/kg de cA2 fue menor que el del grupo de control de D-PBS comenzando en la semana 4 y continuando a lo largo del resto del estudio (semana 8). Tanto los Grupos tratados con TNV148 como el Grupo tratado con 1 mg/kg de cA2 mostraron una reducción significativa en AI en la semana 4. Aunque un estudio previo (documento P-099-017) mostró que TNV148 era ligeramente más eficaz para reducir el Índice Artrítico a continuación de un bolo intraperitoneal de 1 mg/kg único, este estudio demostró que el AI de ambas versiones de los grupos tratados con anticuerpo TNV fue ligeramente mayor. Aunque (con excepción de la semana 6) el Grupo tratado con 1 mg/kg de cA2 no estaba significativamente aumentado en comparación con el grupo de 10 mg/kg de cA2 y los Grupos tratados con TNV148 fueron significativamente mayores en las semanas 7 y 8, no hubo diferencias significativas en AI entre 1 mg/kg de cA2, 1 mg/kg de TNV148 y 1 mg/kg de TNV148B en ningún

punto en el estudio.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención proporciona anticuerpos aislados, recombinantes y/o sintéticos anti-TNF humano, así como composiciones moléculas de ácidos nucleicos codificantes que comprenden al menos un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-TNF de la invención. La presente invención incluye además, aunque sin limitación, usos de tales anticuerpos, por ejemplo en composiciones, métodos y dispositivos de diagnóstico y terapéuticos.

10 Como se usa en este documento, un "anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa", "anticuerpo anti-TNF", "parte de anticuerpo anti-TNF" o "fragmento de anticuerpo anti-TNF" y/o "variante de anticuerpo anti-TNF" y similares incluyen cualquier proteína o péptido que contiene una molécula que comprende al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero sin limitación, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región flanqueante o cualquier parte de las mismas, o al menos una parte de una proteína receptora o de unión de TNF, que se puede incorporar en un anticuerpo de la presente invención. Tal anticuerpo opcionalmente además influye sobre un ligando específico, tal como pero sin limitación, donde tal anticuerpo modula, disminuye, aumenta, antagoniza, agoniza, mitiga, alivia, bloquea, inhibe, anula y/o interfiere con al menos una actividad o unión de TNF, o con una actividad o unión a receptor de TNF, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*. Como un ejemplo no limitante, un anticuerpo anti TNF adecuado, parte especificada o variante se puede unir al menos un TNF o partes, variantes o dominios especificados del mismo. Un anticuerpo, parte especificada o variante anti-TNF adecuado también puede influir opcionalmente sobre al menos una actividad o función de TNF, tal como pero sin limitación, síntesis de ARN, ADN o de proteína, liberación de TNF, señalización de receptor de TNF, escisión de TNF de membrana, actividad de TNF, producción y/o síntesis de TNF. El término "anticuerpo" tiene por objeto además abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, partes y variantes especificadas de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpo o que comprenden partes de anticuerpos que mimetizan la estructura y o función de un anticuerpo o fragmento o parte especificada del mismo, incluyendo anticuerpos de cadena única y fragmentos del mismo. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígeno que se unen a un TNF de mamífero. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a TNF o partes del mismo, incluyendo, pero sin limitación Fab (por ejemplo, mediante digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, mediante digestión y reducción parcial con pepsina) y F(ab')₂ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), facb (por ejemplo, mediante digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, mediante digestión, reducción parcial y reagregación con pepsina), fragmentos de Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular), están abarcados por la invención (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, mencionado anteriormente).

40 Tales fragmentos se pueden producir mediante escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce en la técnica y/o como se ha descrito en este documento. También se pueden producir anticuerpos en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en los que se han introducido uno o más codones de parada cadena arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica una parte de cadena pesada de F(ab')₂ se puede diseñar para que incluya secuencias de ADN que codifican la región CH, de dominio y/o de bisagra de la cadena pesada. Las diversas partes de anticuerpo se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

50 Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, flanqueante, dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_H1, C_H2, C_H3) bisagra, (V_L, V_H)) son sustancialmente no inmunogénicas en seres humanos, con sólo cambios o variaciones de secuencia menores. De forma similar, los anticuerpos denominados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), de roedor (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster y similares) y otros mamíferos designan tales anticuerpos específicos de especie, subgénero, género, subfamilia y familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Tales cambios o variaciones opcionalmente y preferiblemente conservan o reducen la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies con relación a anticuerpos no modificados. Por tanto, un anticuerpo humano es diferente de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano se puede producir mediante un animal no humano o célula procariota o eucariota, que sea capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana reordenados funcionalmente (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena única, el mismo puede comprender un péptido enlazador que no se encuentra en anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como a aproximadamente ocho restos de aminoácidos de glicina o diferentes, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que tales péptidos enlazadores son de origen humano.

65 También se pueden usar anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares que sean anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tengan especificidades de unión por

al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por al menos una proteína de TNF y la otra es por cualquier otro antígeno. Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante etapas de cromatografía por afinidad, es más bien engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se describen, por ejemplo, en el documento WO 93/08829, las Patentes de Estados Unidos N° 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, los documentos WO 91/00360, WO 92/0373, EP 03089, Trauneker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991), Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

Los anticuerpos anti-TNF (también denominados anticuerpos de TNF) de la presente invención opcionalmente se pueden caracterizar mediante unión de afinidad alta a TNF y opcionalmente y preferiblemente teniendo toxicidad baja. En particular, un anticuerpo de la invención, en el que los componentes individuales, tales como la región variable, la región constante y flanqueante, individualmente y/o colectivamente, opcionalmente y preferiblemente poseen inmunogenicidad baja, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que se pueden usar en la invención se caracterizan opcionalmente por su capacidad para tratar pacientes durante periodos prolongados con alivio medible de síntomas y toxicidad baja y/o aceptable. La inmunogenicidad baja o aceptable y/o afinidad alta, así como otras propiedades adecuadas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos. "Inmunogenicidad baja" se define en este documento como que eleva las respuestas de HAHA, HACA o HAMA significativas en menos de aproximadamente el 75% o preferiblemente menos de aproximadamente el 50% de los pacientes tratados y/o que eleva títulos bajos en el paciente tratado (menos de aproximadamente 300, preferiblemente menos de aproximadamente 100 medidos con un inmunoensayo de enzima de doble antígeno) (Elliott *et al.*, *Lancet* 344: 1125-1127 (1994)).

Utilidad

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden usar para la producción de al menos un anticuerpo anti-TNF o variante especificada del mismo, que se puede usar para medir o lograr en una célula, tejido, órgano o animal (incluyendo mamíferos y seres humanos), para diagnosticar, controlar, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de al menos una afección de TNF, seleccionada entre, pero sin limitación, al menos uno de un trastorno o enfermedad inmune, un trastorno o enfermedad cardiovascular, un trastorno o enfermedad infeccioso, maligno y/o neurológico.

Un método de este tipo puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición o una composición farmacéutica que comprenda al menos un anticuerpo anti-TNF a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita tal modulación, tratamiento, alivio, prevención o reducción de síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad eficaz puede comprender una cantidad de aproximadamente 0,001 a 500 mg/kg por administración única (por ejemplo, bolo), múltiple o continua, o para conseguir una concentración en suero de 0,01-5000 µg/ml de concentración en suero por administración única, múltiple o continua, o cualquier intervalo o valor eficaz en el mismo, como se realiza y se determina usando métodos conocidos, como se ha descrito en este documento o como se conoce en las técnicas pertinentes.

Citas

Todas las publicaciones o patentes citadas en este documento muestran el estado de la técnica en el momento de la presente invención y/o proporcionan descripción y posibilitación de la presente invención. Las publicaciones se refieren a cualquier publicación científica o de patente o cualquier otra información disponible en cualquier formato de medios, incluyendo todos los formatos grabados, electrónicos o impresos. Las siguientes referencias se mencionan específicamente: Ausubel, *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Anticuerpos de la Presente Invención

Al menos un anticuerpo anti-TNF de la presente invención se puede producir opcionalmente mediante una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o población clonal de células inmortalizadas, como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *et al.*,

eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

5 Los anticuerpos humanos que son específicos para proteínas de TNF humanas o fragmentos de las mismas se puede generar frente a un antígeno inmunogénico apropiado, tal como proteína aislada y/o de TNF o una parte de la misma (incluyendo moléculas sintéticas, tales como péptidos sintéticos). Otros anticuerpos específicos o generales de mamífero se pueden generar de forma similar. La preparación de antígenos inmunogénicos y producción de anticuerpo monoclonal se puede realizar usando cualquier técnica adecuada.

10 En un enfoque, se produce un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero sin limitación, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A o similares o heteromielomas, productos de fusión de los mismos o cualquier célula o célula de fusión obtenida de los mismos o cualquier línea celular adecuada como se
15 conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com y similares, con células productoras de anticuerpo, tales como, pero sin limitación, células de bazo, de sangre periférica, de ganglios linfáticos, de amígdalas u otras células inmunes o que contienen células B aisladas o clonadas o cualquiera de otras células que expresan secuencias de cadena pesada o ligera constante o variable o flanqueante o CDR, como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como ADN genómico, ADNc, ADNr, ADN mitocondrial o ARN recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de algas, procarionta, de anfibio, de insecto, de reptil, de pez, de mamífero, de roedor, de equino, de ovino, de cabra, de oveja, de primate, eucariota, ADN o ARN de cloroplasto, ARNhn, ARNm, ARNt, de cadena única, doble o triple, hibridado y similares o cualquier combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, Ausubel, mencionado anteriormente y Colligan, *Immunology*, mencionado anteriormente, capítulo 2.

25 También se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir de la sangre periférica o, preferiblemente el bazo o ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que se han inmunizado con el antígeno de interés. También se puede usar cualquier otra célula huésped adecuada para expresar ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes se pueden aislar usando
30 condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados y clonarse mediante dilución límite o separación celular u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden seleccionar mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

35 Se pueden usar otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad necesaria, incluyendo, pero sin limitación, métodos que seleccionan anticuerpo recombinante a partir de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero sin limitación, una biblioteca de presentación de bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc o similares; por ejemplo, como las disponibles en Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, Reino Unido; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Alemania; Biovation, Aberdeen, Escocia, Reino Unido; BioInvent, Lund, Suecia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Véanse, por
40 ejemplo, los documentos EP 368684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (12/5/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT / MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PGT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps), EP 614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); U.S. 4.704.692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; PE 371 998, EP 550 400, (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys);
45 o péptidos o proteínas generados de forma estocástica, los documentos US5723323, 5763192, 5814476, 5817483 , 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, ahora Applied Molecular Evolution (AME)) o que dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 41: 901-907 (1997); Sandhu *et al.*, *Crit. Rev. Biotechnol.* 16: 95-118 (1996); Eren *et al.*, *Immunol.* 93: 154-161 (1998), así como patentes y solicitudes relacionadas) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se ha descrito en este documento. Tales técnicas, incluyen, pero sin limitación,
50 presentación en ribosoma (Hanes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Estados Unidos.* 94: 4937-4942 (May 1997); Hanes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Estados Unidos.* 95: 14130-14135 (Nov. 1998)); tecnologías de producción de anticuerpo de célula única (por ejemplo, método de anticuerpo de linfocito seleccionado ("SLAM") (Patente de Estados Unidos N° 5.627.052, Wen *et al.*, *J. Immunol.* 17: 887-892 (1987); Babcook *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Estados Unidos.* 93: 7843-7848 (1996)); microgotas de gel y citometría de flujo (Powell *et al.*, *Biotechnol.* 8: 333-337 (1990), One Cell Systems, Cambridge, MA, Gray *et al.*, *J. Imm. Meth.* 182: 155-163 (1995); Kenny *et al.*, *Bio/Technol.* 13: 787-790 (1995)); selección de células B (Steenbakkers *et al.*, *Molec. Biol. Reports* 19: 125-134 (1994); Jonak *et al.*, *Progress Biotech*, Vol. 5, *In Vitro* Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Países Bajos (1988).

60 Los métodos para modificar por ingeniería genética o humanizar anticuerpos no humanos o humanos también se pueden usar y son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado o modificado por ingeniería genética tiene uno o más restos de aminoácidos de una fuente que es no humana, por ejemplo, pero sin limitación de ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácidos humanos con frecuencia se denominan restos "importados", que típicamente se toman a partir de una variable, constante u otro
65

dominio "importado" de una secuencia humana conocida. Las secuencias de Ig humana conocidas se describen, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/online-comp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.wh-freeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Inunune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.aatibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehimeu.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/~jraatsl/inks1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/limt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CCccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health (1983).

Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o para reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, asociación, disociación, avidéz, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. Generalmente, parte o todas las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se reemplazan con aminoácidos humanos u otros aminoácidos. Opcionalmente, los anticuerpos también se pueden humanizar con retención de la afinidad alta por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados se pueden preparar opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los especialistas en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras de conformación tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar restos de FR y combinarse a partir de las secuencias de consenso y de importación de forma que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como la afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia de la unión a antígeno. La humanización o modificación por ingeniería genética de anticuerpos de la presente invención se puede realizar usando cualquier método conocido, tal como, pero sin limitación los descritos en, Winter (Jones *et al.*, Nature 321: 522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151: 2623 (1993), Patentes de Estados Unidos Nº 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, los documentos PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, incluidas las referencias citadas en los mimos.

El anticuerpo anti-TNF también se puede generar opcionalmente inmunizando un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, hámster, primate no humano y similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se ha descrito en este documento y/o como se conoce en la técnica. Las células que producen un anticuerpo anti-TNF humano se pueden aislar a partir de tales animales e inmortalizarse usando métodos adecuados, tales como los métodos descritos en este documento.

Se pueden producir ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos que se unan a antígenos humanos mediante métodos conocidos (por ejemplo, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.770.428, 5.569.825, 5.545.806, 5.625.126, 5.625.825, 5.633.425, 5.661.016 y 5.789.650 expedida a Lonberg *et al.*; Jakobovits *et al.*, el documento WO 98/50433, Jakobovits *et al.*, el documento WO 98/24893, Lonberg *et al.*, el documento WO 98/24884, Lonberg *et al.*, el documento WO 97/13852, Lonberg *et al.*, el documento WO 94/25585, Kucherlapate *et al.*, el documento WO 96/34096, Kucherlapate *et al.*, el documento EP 0463 151 B1, Kucherlapate *et al.*, el documento EP 0710 719 A1, Surani *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.545.807, Bruggemann *et al.*, el documento WO 90/04036, Bruggemann *et al.*, el documento EP 0438 474 B1, Lonberg *et al.*, el documento EP 0814 259 A2, Lonberg *et al.*, el documento GB 2 272 440 A, Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994), Taylor *et al.*, Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1.994), Green *et al.*, Nature Genetics 7: 13-21 (1994), Mendez *et al.*, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Taylor *et al.*, Nucleic Acids Research 20 (23): 6287-6295 (1992), Tuailon *et al.*, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. 90 (8)3720-3724 (1993), Lonberg *et al.*, Int Rev Immunol 13 (1): 65-93 (1995) y Fishwald *et al.*, Nat

Biotechnol 14 (7): 845-851 (1996). En general, estos ratones comprenden al menos un transgén que comprende ADN de al menos un locus de inmunoglobulina humana que se transpone funcionalmente o que puede experimentar transposición funcional. Los loci de inmunoglobulina endógenos en tales ratones se pueden alterar o suprimir para eliminar la capacidad del animal de producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

5 La selección de anticuerpos para unión específica a proteínas o fragmentos similares se puede conseguir de manera práctica usando bibliotecas de presentación de péptidos. Este método implica la exploración de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tengan la función o estructura deseada. La selección de anticuerpos de bibliotecas de presentación de péptido se conoce bien en la técnica. Las secuencias de péptidos presentadas pueden tener de 3 a 5000 o más aminoácidos de longitud, frecuentemente de 5-100 aminoácidos de longitud y con frecuencia de aproximadamente 8 a 25 aminoácidos de longitud. Además de los métodos de síntesis química directos para generar bibliotecas de péptidos, se han descrito varios métodos de ADN recombinante. Un tipo implica la presentación de una secuencia de péptidos en la superficie de un bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de péptidos presentada particular. Tales métodos se describen en las Publicaciones de Patente PCT N° 91/17271, 91/18980, 91/19818 y 93/08278. Otros sistemas para generar bibliotecas de péptidos tienen aspectos tanto de síntesis química *in vitro* como de métodos recombinantes. Véanse, las Publicaciones de Patente PCT N° 92/05258, 92/14843 y 96/19256. Véanse también, las Patentes de Estados Unidos N° 5.658.754 y 5.643.768. Las bibliotecas de presentación de péptido, vectores y kits de exploración están disponibles en el mercado a partir de proveedores tales como Invitrogen (Carlsbad, CA) y Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido). Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, cedidas a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, cedidas a Dyax, 5427908, 5580717, cedidas a Affymax, 5885793, cedida a Cambridge Antibody Technologies; 5750373, cedida a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, cedida a Xoma, Colligan, mencionado anteriormente; Ausubel, mencionado anteriormente o Sambrook, mencionado anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden preparar usando al menos un ácido nucleico que codifica anticuerpo anti-TNF para proporcionar animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Tales animales se pueden proporcionar usando métodos conocidos. Véanse, por ejemplo, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos N° 5.827.690, 5.849.992, 4.873.316, 5.849.992, 5.994.616, 5.565.362, 5.304.489 y similares.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar adicionalmente usando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TNF para proporcionar plantas y células de plantas cultivadas transgénicas (por ejemplo, pero sin limitación tabaco y maíz) que producen tales anticuerpos, partes especificadas o variantes en las partes de planta o células cultivadas a partir de las mismas. Como un ejemplo no limitante, las hojas de tabaco transgénicas que expresan proteínas recombinantes se han usado de forma satisfactoria para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer *et al.*, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95-118 (1999) y referencias citadas en el mismo. También, se ha usado maíz transgénico para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comerciales, con actividades biológicas equivalentes a las que se producen en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147 (1999) y referencias citadas en el mismo. También se han producido anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas incluyendo fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos de cadena única (scFv), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad *et al.*, Plant Mol. Biol. 38: 101-109 (1998) y referencia citada en el mismo. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención también se pueden producir usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos. Véanse también, por ejemplo, Fischer *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (Oct, 1999), Ma *et al.*, Trends Biotechnol. 13: 522-7 (1995); Ma *et al.*, Plant Physiol. 109: 341-6 (1995); Whitlam *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 22: 940-944 (1994) y referencias citadas en las mismas.

Los anticuerpos de la invención se pueden unir a TNF humano con un amplio intervalo de afinidades (K_D). En una realización preferida, al menos un mAb humano de la presente invención se puede unir opcionalmente a TNF humano con afinidad alta. Por ejemplo, un mAb humano se puede unir a TNF humano con una K_D igual o menor de aproximadamente 10^{-7} M, tal como, pero sin limitación 0,1-9,9 (o cualquier intervalo o valor dentro del mismo) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o cualquier intervalo o valor dentro de los mismos.

La afinidad o avidéz de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992); y métodos descritos en los mismos). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal y pH). Por tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_0 , K_a , K_d) preferiblemente se realizan con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno y un tampón normalizado, tal como el tampón descrito en este documento.

Moléculas de Ácido Nucleico

Usando una información proporcionada en este documento, una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica al menos un anticuerpo anti-TNF se puede obtener usando métodos descritos en este documento o como se conoce en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNhn, ARNt o cualquier otra forma o en forma de ADN, incluyendo pero sin limitación, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido sintéticamente o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario o cualquier combinación de las mismas. Cualquier parte de al menos una hebra del ADN o ARN puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra sentido o la misma puede ser la hebra no codificante, también denominada la hebra antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en este documento incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden una fase de lectura abierta (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero sin limitación, al menos una parte especificada de al menos una CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada (por ejemplo, SEC ID N°: 1-3) o cadena ligera (por ejemplo, SEC ID N°: 4-6); moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificante de un anticuerpo anti-TNF o región variable (por ejemplo, SEC ID N°: 7 y 8) y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las que se han descrito anteriormente pero la cual, debido a la degeneración del código genético, todavía codifica al menos un anticuerpo anti-TNF como se ha descrito en este documento y/o como se conoce en la técnica. Por supuesto, el código genético se conoce bien en la técnica. Por tanto, será de rutina para un especialista en la técnica la generación de tales variantes de ácido nucleico degeneradas que codifiquen anticuerpos anti-TNF específicos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, mencionado anteriormente. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen SEC ID N°: 10, 11, 12, 13, 14 y 15, correspondientes a ejemplos no limitantes de un ácido nucleico que codifica, respectivamente, HC de CDR1, HC de CDR2, HC de CDR3, LC de CDR1, LC de CDR2 y LC de CDR3.

Como se ha indicado en este documento, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TNF pueden incluir, aunque sin limitación, las que codifican la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo, por sí mismo; la secuencia codificante para el anticuerpo completo o una parte del mismo; la secuencia codificante para un anticuerpo, fragmento o parte, así como secuencias adicionales, tales como la secuencia codificante de al menos un péptido señal líder o de fusión, con o sin las secuencias codificantes adicionales mencionadas anteriormente, tales como al menos un intrón, junto con secuencias no codificantes adicionales, incluyendo pero sin limitación, secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas no traducidas que juegan un papel en la transcripción, procesamiento de ARNm, incluyendo señales de corte y empalme y de poliadenilación (por ejemplo, unión a ribosoma y estabilidad de ARNm); una secuencia codificante adicional de codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. Por tanto, la secuencia que codifica un anticuerpo se puede fusionar a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende un fragmento o parte de anticuerpo.

Construcción de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden preparar usando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación o combinaciones de las mismas, como se conoce bien en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden comprender de forma práctica secuencias además de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, un sitio de multi-clonación que comprenda uno o más sitios de restricción de endonucleasa se puede insertar en el ácido nucleico para ayudar al aislamiento del polinucleótido. También, se pueden insertar secuencias traducibles para ayudar en el aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención, excluyendo la secuencia codificante, es opcionalmente un vector, un adaptador o enlazador para clonación y/o expresión de un polinucleótido de la presente invención.

Se pueden añadir secuencias adicionales a tales secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y enlazadores se conoce bien en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, mencionado anteriormente, o Sambrook, mencionado anteriormente).

Métodos Recombinantes para Construcción de Ácidos Nucleicos.

Las composiciones de ácido nucleico aislado de esta invención, tales como ARN, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos, se puede obtener a partir de fuentes biológicas usando cualquier número de metodologías de clonación conocidas por los especialistas en la técnica. En algunas realizaciones, se usan sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, en condiciones rigurosas, a los polinucleótidos de la presente invención para identificar la secuencia deseada en una biblioteca de ADNc o ADN genómico. Los especialistas en la técnica conocen el aislamiento de ARN y construcción de ADNc y bibliotecas genómicas. (Véase, por ejemplo, Ausubel, mencionado anteriormente, o Sambrook, mencionado anteriormente).

Métodos de Selección y/o Aislamiento de Ácido Nucleico.

Un ADNc o una biblioteca genómica se puede explorar usando una sonda basándose en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, tales como las que se describen en este documento. Se pueden usar sondas para hibridar con secuencias de ADN genómico o ADNc para aislar genes homólogos en organismos iguales o diferentes. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden emplear diversos grados de rigurosidad de hibridación en el ensayo; y la hibridación o el medio de lavado pueden ser rigurosos. A medida que las condiciones de hibridación se hacen más rigurosas, tiene que haber un grado mayor de complementariedad entre la sonda y la diana para que ocurra la formación de dúplex. El grado de rigurosidad se puede controlar por uno o más entre temperatura, fuerza iónica, pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturizante tal como formamida. Por ejemplo, la rigurosidad de hibridación se varía de forma práctica cambiando la polaridad de la solución reactante a través de, por ejemplo, manipulación de la concentración de formamida dentro del intervalo del 0% al 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) necesario para la unión detectable variará de acuerdo con la rigurosidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente del 100% o del 70-100% o cualquier intervalo o valor dentro de los mismos. Sin embargo, se debe apreciar que las variaciones de secuencia menores en las sondas y cebadores se pueden compensar reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación y/o de lavado.

Los métodos de amplificación de ARN o ADN se conocen bien en la técnica y se puede usar de acuerdo con la presente invención sin experimentación excesiva, basándose en los contenidos y la directriz presentada en este documento.

Los métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188, de Mullis, *et al.*; 4.795.699 y 4.921.794 de Tabor, *et al.*; 5.142.033 de Innis, 5.122.464 de Wilson, *et al.*; 5.091.310 de Innis, 5.066.584 de Gyllensten, *et al.*; 4.889.818 de Gelfand, *et al.*; 4.994.370 de Silver, *et al.*; 4.766.067 de Biswas; 4.656.134 de Ringold) y amplificación mediada por ARN que usa ARN antisentido para dirigir la secuencia como un molde para síntesis de ADN bicatenario (Patente de Estados Unidos N° 5.130.238 de Malek, *et al.*, con la marca comercial NASBA). (Véase, por ejemplo, Ausubel, mencionado anteriormente o Sambrook, mencionado anteriormente.).

Por ejemplo, se puede usar tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y genes relacionados directamente a partir de bibliotecas de ADN genómico o ADNc. También pueden ser útiles PCR y otros métodos de amplificación *in vitro*, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifiquen proteínas que se tienen que expresar, para preparar ácidos nucleicos para uso como sondas para detectar la presencia del ARNm deseado en muestras, para secuenciación de ácido nucleico o con otros propósitos. Los ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a especialistas a través de métodos de amplificación *in vitro* se encuentran en Berger, mencionado anteriormente, Sambrook, mencionado anteriormente y Ausubel, mencionado anteriormente, así como Mullis, *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.683.202 (1987) e Innis, *et al.*, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990). En la técnica se conocen kits disponibles en el mercado para amplificación por PCR genómica. Véase, por ejemplo, Kit Advantage-GC Genomic PCR (Clontech). Adicionalmente, se puede usar, por ejemplo, la proteína 32 del gen T4 (Boehringer Mannheim) para mejorar el rendimiento de productos de PCR largos.

Métodos Sintéticos para Construcción de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también se pueden preparar mediante síntesis química directa mediante métodos conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, mencionado anteriormente). La síntesis química generalmente produce un oligonucleótido monocatenario, que se puede convertir en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la hebra única como un molde. Un especialista en la técnica reconocerá que mientras la síntesis química de ADN puede limitarse a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante el ligamiento de secuencias más cortas.

Casetes para la Expresión Recombinante

La presente invención proporciona además casetes para la expresión recombinante que comprenden un

ácido nucleico de la presente invención. Una secuencia de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo un ADNc o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo de la presente invención, se puede usar para construir un casete para la expresión recombinante que se puede introducir en al menos una célula huésped deseada. Un casete para la expresión recombinante típicamente comprenderá un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a secuencias reguladoras de inicio de la transcripción que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula huésped pretendida. Se pueden emplear promotores tanto heterólogos como no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de ácidos nucleicos de la presente invención.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados que sirven como promotores, potenciadores u otros elementos se pueden introducir en la posición apropiada (cadena arriba, cadena abajo o en intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención de forma de regular positivamente o negativamente la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, se pueden alterar promotores endógenos *in vivo* o *in vitro* mediante mutación, supresión y/o sustitución.

15 Vectores y Células Huésped

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, células huésped que se modifican por ingeniería genética con los vectores recombinantes y la producción de al menos un anticuerpo anti-TNF mediante técnicas recombinantes, como se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, mencionado anteriormente y Ausubel, *et al.*, mencionado anteriormente.

Los polinucleótidos se pueden unir opcionalmente a un vector que contiene un marcador seleccionable para propagación en un hospedador. En general, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, el mismo se puede empaquetar *in vitro* usando una línea celular de empaquetamiento apropiada y después transducirse a células huésped.

El inserto de ADN se debe unir operativamente a un promotor apropiado. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para inicio y terminación de transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para traducción. La parte codificante de las transcritos maduros expresada por las construcciones preferiblemente incluirá un inicio de traducción en el comienzo y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) colocado apropiadamente en el extremo del ARNm que se tiene que traducir, prefiriéndose UAA y UAG para expresión en células de mamífero o eucariotas.

Los vectores de expresión preferiblemente pero opcionalmente incluirán al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, aunque sin limitación, resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, Patentes de Estados Unidos N° 4.399.216, 4.634.665, 4.656.134, 4.956.288, 5.149.636, 5.179.017, ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico o glutamina sintetasa (GS, Patente de Estados Unidos N° 5.122.464, 5.770.359, 5.827.739) para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivo en *E. coli* y otras bacterias o procariotas. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica. Los vectores adecuados serán fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica. La introducción de una construcción de vector en una célula huésped se puede lograr mediante transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Tales métodos se describen en la técnica, tal como en Sambrook, mencionado anteriormente, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, mencionado anteriormente, capítulos 1, 9, 13, 15 y 16.

Al menos un anticuerpo de la presente invención se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, se puede añadir al extremo N de un anticuerpo para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante purificación o durante manejo y almacenamiento posterior. También, se pueden añadir restos peptídicos a un anticuerpo de la presente invención para facilitar la purificación. Tales regiones se pueden retirar antes de una preparación final de un anticuerpo o al menos un fragmento del mismo. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, mencionado anteriormente, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, mencionado anteriormente, capítulos 16, 17 y 18.

Los especialistas en la técnica tienen conocimiento de numerosos sistemas de expresión disponibles para expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención.

Como alternativa, los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden expresar en una célula huésped mediante activación (por manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos se conocen bien en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y 5.733.761.

Las células de mamífero son ilustrativas de cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos, partes especificadas o variantes de los mismos. Los sistemas de células de mamífero con frecuencia estarán en forma de monocapas de células, aunque también se pueden usar suspensiones o biorreactores de células de mamíferos. En la técnica se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de expresar proteínas glicosiladas intactas e incluyen las líneas de células COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), CHO (por ejemplo, ATCC CRL 1610) y BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26) células COS-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0- Ag14, células 293, células HeLa y similares, que están fácilmente disponibles en, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA (www.atcc.org). Las células huésped preferidas incluyen células de origen linfoide, tales como células de mieloma y de linfoma. Las células huésped particularmente preferidas son las células P3X63Ag8.653 (Número de Acceso de ATCC CRL-1580) y células SP2/0-Ag14 (Número de Acceso de ATCC CRL-1851). En una realización particularmente preferida, la célula recombinante es una célula P3X63Ag8.653 o una célula SP2/0-Ag14.

Los vectores de expresión de estas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de expresión, tales como, pero sin limitación, un origen de replicación; un promotor (por ejemplo, promotores tardío o temprano de SV40, el promotor de CMV (Patentes de Estados Unidos N° 5.168.062 y 5.385.839), un promotor tk de HSV, un promotor pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor EF-1 alfa (Patente de Estados Unidos N° 5.266.491), al menos un promotor de inmunoglobulina humana, un potenciador y/o sitios de información de procesamiento, tales como sitios de unión de ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de adición de poli A de Ag T grande de SV40) y secuencias de terminación de transcripción. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente y Sambrook, *et al.*, mencionado anteriormente. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención se conocen y/o están disponibles, por ejemplo, en el Catálogo de Líneas Celulares e Hibridomas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (www.atcc.org) u otras fuentes comerciales o conocidas.

Cuando se emplean células huésped eucariotas, típicamente se incorporan en el vector secuencias de poliadenilación o de terminación de transcripción. Un ejemplo de una secuencia de terminación es la secuencia de poliadenilación del gen de hormona de crecimiento bovina. Las secuencias para corte y empalme preciso del transcrito también se pueden incluir. Un ejemplo de una secuencia de corte y empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, *et al.*, J. Virol. 45: 773-781 (1983)). Adicionalmente, se pueden incorporar en el vector secuencias génicas para controlar la replicación en la célula huésped, como se conoce en la técnica.

Purificación de un Anticuerpo

Un anticuerpo anti-TNF se puede recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo pero sin limitación, purificación de proteína A, precipitación de sulfato de amonio o de etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. También se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, capítulos 1, 4, 6, 8, 9 y 10.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos de síntesis química y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador eucariota, incluyendo, por ejemplo, células de levadura, de plantas superiores de insecto y de mamífero. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención se puede ser glicosilado o puede ser no glicosilado, prefiriéndose glicosilado. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, mencionado anteriormente, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, mencionado anteriormente, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein Science, mencionado anteriormente, capítulos 12-14.

Anticuerpos Anti-TNF

Los anticuerpos aislados de la presente invención comprenden la secuencia de aminoácidos de anticuerpo específica mencionada en las reivindicaciones adjuntas codificada por cualquier polinucleótido adecuado o cualquier anticuerpo aislado o preparado. Preferiblemente, el anticuerpo humano se une a TNF humano y, de ese modo, neutraliza parcialmente o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo que neutraliza sustancialmente, parcialmente o preferiblemente al menos una actividad biológica de al menos una proteína o fragmento de TNF se puede unir a la proteína o fragmento e inhibir, de ese modo, actividades mediadas a través de la unión de TNF al receptor de TNF o a través de otros mecanismos dependientes o mediados por TNF. Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de TNF en aproximadamente el 20-120%, preferiblemente en al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, el 100% o más dependiendo del

ensayo. La capacidad de un anticuerpo anti-TNF para inhibir una actividad dependiente de TNF se evalúa preferiblemente mediante al menos un ensayo de proteína o receptor de TNF adecuado, como se describe en este documento y/o como se conoce en la técnica. Un anticuerpo humano de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo humano comprende una cadena pesada de IgG o fragmento definido, por ejemplo, al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de este tipo se pueden preparar empleando un ratón transgénico u otro mamífero no humano transgénico que comprenda al menos un transgén de cadena ligera humana (por ejemplo, IgG, IgA e IgM (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$) como se ha descrito en este documento y/o como se conoce en la técnica. En otra realización, el anticuerpo humano anti-TNF humano comprende una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.

Al menos un anticuerpo de la invención se une al menos un epítipo especificado, específico para al menos una proteína, subunidad, fragmento, parte de TNF o cualquier combinación de las mismas. El al menos un epítipo puede comprender al menos una región de unión a anticuerpo que comprende al menos una parte de dicha proteína, epítipo que preferiblemente está comprendido de al menos una parte extracelular, soluble, hidrófila, externa o citoplasmática de dicha proteína. El al menos un epítipo especificado puede comprender cualquier combinación de al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 1-3 aminoácidos para la parte especificada entera de aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 9.

El anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano o fragmento que enlaza con el antígeno del mismo que tiene tres CDRs de la cadena pesada y tres CDRs de la cadena ligera, en donde las tres CDRs de la cadena pesada tienen la secuencia de aminoácidos de las CDRs correspondientes de mAb de TNV148 como se ha descrito en la Figura 4; las tres CDRs de la cadena ligera tienen la secuencia de aminoácidos de CDRs correspondientes mAb de TNV148 como se ha descrito en la Figura 5; y el anticuerpo o fragmento enlaza con TNF humano con una K_D igual o menor de $0,1-9,9 \times 10^{-11}$ M. Tales anticuerpos se pueden preparar uniendo químicamente las diversas partes (por ejemplo, CDR, flanco) del anticuerpo usando técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo usando técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante o usando cualquier otro método adecuado.

El anticuerpo anti-TNF puede comprender las regiones variables de cadena pesada y ligera de un mAb de TNV148 y mAb de TNV148B como se ha descrito en las Figuras 4 y 5. Los anticuerpos que se unen al TNF humano y que comprenden una región variable de cadena pesada o ligera se pueden preparar usando métodos adecuados, tales como presentación en fago (Katsube, Y., *et al.*, *Int J Mol. Med.*, 1 (5): 863-868 (1998)) o métodos que emplean animales transgénicos, como se conoce en la técnica y/o se ha descrito en este documento. Por ejemplo, un ratón transgénico, que comprende un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina humana reordenado funcionalmente y un transgén que comprende ADN de un locus de cadena ligera de inmunoglobulina humana que puede experimentar reordenamiento funcional, se puede inmunizar con TNF humano o un fragmento del mismo para provocar la producción de anticuerpos. Si se desea, las células productoras de anticuerpos se pueden aislar y se pueden preparar hibridomas u otras células productoras de anticuerpo inmortalizadas como se ha descrito en este documento y/o como se conoce en la técnica. Como alternativa, el anticuerpo, parte especificada o variante se puede expresar usando el ácido nucleico codificante o parte del mismo en una célula huésped adecuada.

Una sustitución de aminoácido conservativa se refiere al reemplazo de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofiliidad) que son similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservativas incluyen reemplazo de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Códigos de Amino Ácidos

Los aminoácidos que forman los anticuerpos anti-TNF de la presente invención con frecuencia se abrevian. Las denominaciones de aminoácidos se pueden indicar designando el aminoácido por su código de letra única, su código de tres letras, nombre, o el codón o codones de tres nucleótidos como se aprecia en la técnica (véase Alberts, B., *et al.*, *Molecular Biology of The Cell*, Tercera Ed., Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1994):

	CÓDIGO DE LETRA ÚNICA	CÓDIGO DE TRES LETRAS	NOMBRE	CODÓN O CODONES DE TRES NUCLEÓTIDOS
5	A	Ala	Alanina	GCA, GCC, GCG, GCU
	C	Cys	Cisteína	UGC, UGU
	D	Asp	Ácido aspártico	GAC, GAU
10	E	Glu	Ácido Glutámico	GAA, GAG
	F	Phe	Fenilalanina	UUC, UUU
	G	Gly	Glicina	GGA, GGC, GGG, GGU
15	H	His	Histidina	CAC, CAU
	I	Ile	Isoleucina	AUA, AUC, AUU
	K	Lys	Lisina	AAA, AAG
20	L	Leu	Leucina	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
	M	Met	Metionina	AUG
	N	Asn	Asparagina	AAC, AAU
25	P	Pro	Prolina	CCA, CCC, CCG, CCU
	Q	Gln	Glutamina	CAA, CAG
	R	Arg	Arginina	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
30	S	Ser	Serina	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
	T	Thr	Treonina	ACA, ACC, ACG, ACU
	V	Val	Valina	GUA, GUC, GUG, GUU
35	W	Trp	Triptófano	UGG
	Y	Tyr	Tirosina	UAC, UAU

40 Un anticuerpo anti-TNF de la presente invención puede incluir una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos, a partir de mutaciones naturales o de manipulación humana, como se especifica en este documento.

45 Por supuesto, el número de sustituciones de aminoácidos que un especialista realizaría depende de muchos factores, incluyendo los que se han descrito anteriormente. De forma general, el número de sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos para cualquier anticuerpo anti-TNF fragmento o variante dado, no será de más de 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tales como 1-30 o cualquier intervalo o valor dentro del mismo, como se especifica en este documento.

50 Los aminoácidos en un anticuerpo anti-TNF de la presente invención que son esenciales para función se pueden identificar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis mediante alanina (por ejemplo, Ausubel, mencionado anteriormente, capítulos 8, 15; Cunningham y Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce una mutación de alanina única en cada resto en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes después se ensayan para determinar la actividad biológica, tal como, pero sin limitación, al menos una actividad neutralizante de TNF. Los sitios que son críticos para unión a anticuerpo también se pueden identificar mediante análisis estructural tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje por fotoafinidad (Smith, *et al.*, J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992) y de Vos, *et al.*, Science 255: 306-312 (1992)).

60 Como lo apreciarán los especialistas, la presente invención incluye al menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos el 20%, el 30% o el 40% y preferiblemente al menos el 50%, el 60% o el 70% y más preferiblemente al menos el 80%, el 90% o el 95% -1000% de la del anticuerpo endógeno o relacionado conocido nativo (no sintético). Los métodos para ensayar y cuantificar mediciones de actividad enzimática y especificidad de sustrato, son bien

65

conocidos por los especialistas en la técnica.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos que enlazan con el antígeno, como se describe en este documento, que se modifican mediante la unión covalente de un resto orgánico. Tal modificación puede producir un anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, semivida en suero *in vivo* aumentada). El resto orgánico puede ser un grupo polimérico hidrófilo lineal o ramificado, un grupo de ácido graso o un grupo de éster de ácido graso. En realizaciones particulares, el grupo polimérico hidrófilo puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 120.000 Dalton y puede ser un polialcano glicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), propilenglicol (PPG)), polímero de carbohidrato, polímero de aminoácido o polivinil pirrolidona y el grupo de ácido graso o de éster de ácido graso puede comprender de aproximadamente ocho a aproximadamente cuarenta átomos de carbono.

Los anticuerpos y fragmentos que enlazan con el antígeno modificados de la invención pueden comprender uno o más restos orgánicos que estén unidos covalentemente, directamente o indirectamente, al anticuerpo. Cada resto orgánico que está unido a un anticuerpo de la invención puede ser independientemente un grupo polimérico hidrófilo, un grupo de ácido graso o un grupo de éster de ácido graso. Como se usa en este documento, la expresión "ácido graso" abarca ácidos mono carboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Un "grupo polimérico hidrófilo", como se usa la expresión en este documento, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. Por tanto, un anticuerpo modificado mediante la unión covalente de polilisina está abarcado por la invención. Los polímeros hidrófilos adecuados para modificar anticuerpos de la invención pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcano glicoles (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietilenglicol (mPEG), PPG y similares), carbohidratos (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de aminoácidos hidrófilos (por ejemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialcano (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de propileno y similares) y polivinil pirrolidona. Preferiblemente, el polímero hidrófilo que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 150.000 Dalton como una entidad molecular separada. Por ejemplo, se pueden usar PEG₅₀₀₀ y PEG_{20.000}, en los que el subíndice es el peso molecular promedio del polímero en Dalton. El grupo polimérico hidrófilo se puede sustituir con uno a aproximadamente seis grupos alquilo, de ácido graso o de éster de ácido graso. Los polímeros hidrófilos que se sustituyen con un grupo de ácido graso o de éster de ácido graso se pueden preparar empleando métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo amina se puede acoplar a un carboxilato del ácido graso o del éster de ácido graso y un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonil diimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso se puede acoplar a un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar anticuerpos de la invención se pueden saturar o pueden contener una o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), N-tetradecanoato (C₁₄, miristato), N-octadecanoato (C₁₈, estearato), N-eicosanoato (C₂₀, araquidato), N-docosanoato (C₂₂, behenato), N-triacontanoato (C₃₀), N-tetracontanoato (C₄₀), *cis*- Δ 9-octadecanoato (C₁₈, oleato), todos *cis*- Δ 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoato (C₂₀ araquidonato), ácido octanedioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen mono-ésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a aproximadamente doce, preferiblemente uno a aproximadamente seis, átomos de carbono.

Los anticuerpos humanos modificados se pueden preparar usando métodos adecuados, tales como mediante reacción de uno o más agentes modificantes. Un "agente modificante" como se usa la expresión en este documento, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrófilo, un ácido graso o un éster de ácido graso) que comprende un grupo activador. Un "grupo activador" es un resto químico o grupo funcional que puede, en condiciones apropiadas, reaccionar con un segundo grupo químico formando de ese modo un enlace covalente entre el agente modificante y el grupo químico. Por ejemplo, los grupos activadores reactivos a amina incluyen grupos electrófilos tales como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), N-hidroxisucinimidil ésteres (NHS) y similares. Los grupos activación que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilililo, disulfuros de piridilo, ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico tiol (TNB-tiol) y similares. Un grupo funcional aldehído se puede acoplar a moléculas que contienen amida o hidrazida y un grupo azida puede reaccionar con un grupo de fósforo trivalente para formar enlaces de fosforamido o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos activadores en moléculas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, GT, Bioconjugate Techniques Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo activador se puede unir directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrófilo, ácido graso o éster de ácido graso) o a través de un resto enlazador, por ejemplo, un grupo C₁-C₁₂ divalente en el que uno o más átomos de carbono se pueden reemplazar por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los restos enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- y -CH₂O-CH₂-CH₂-O-CH-CH₂-O-CH-NH-. Los agentes modificantes que comprenden un resto enlazador se pueden producir, por ejemplo, haciendo reaccionar una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilendiamina, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc se puede retirar del producto mediante tratamiento con ácido

trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que se puede acoplar a otro carboxilato como se ha descrito o se puede hacer reaccionar con anhídrido maleico y el producto resultante ciclarse para producir un derivado maleimido activado del ácido graso. (Véase, por ejemplo, Thompson, *et al.*, el documento WO 92/16221).

5 Los anticuerpos modificados de la invención se pueden producir haciendo reaccionar un anticuerpo humano con un agente modificante. Por ejemplo, los restos orgánicos se pueden unir al anticuerpo de una manera no específica de sitio empleando un agente modificante reactivo a amina, por ejemplo, un NHS éster de PEG. Los anticuerpos humanos modificados también se pueden preparar reduciendo los enlaces de disulfuro (por ejemplo, enlaces de disulfuro intracadena) de un anticuerpo o fragmento de unión antígeno. Después, el anticuerpo reducido se puede hacer reaccionar con un agente modificante reactivo a tiol para producir el anticuerpo modificado de la invención. Los anticuerpos humanos modificados que comprenden un resto orgánico que está unido a sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención se pueden preparar usando métodos adecuados, tales como proteólisis inversa (Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10): 2233-2241 (1997); Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)), y los métodos descritos en Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-TNF

20 La presente invención también proporciona al menos una composición de anticuerpo anti-TNF que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más anticuerpos anti-TNF de la misma, como se ha descrito en este documento y/o como se conoce en la técnica que se proporcionan en una composición, mezcla o forma de origen no natural. Las composiciones de anticuerpo anti-TNF de la presente invención pueden comprender además al menos una de cualquier cantidad eficaz y adecuada de una composición o composición farmacéutica que comprenda al menos un anticuerpo anti-TNF para una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita tal modulación, tratamiento o terapia, comprendiendo además opcionalmente al menos uno seleccionado entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero sin limitación un anticuerpo de TNF o fragmento, un receptor de TNF o fragmento soluble, proteínas de fusión del mismo o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxycloquinina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglicósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, un tetraciclina u otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabolizante, 35 un agente relacionado con diabetes, un mineral, un agente nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antiácidico, un antitúxico, un antiemético, un antiácido, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen) un sargramostim (GM-CSF, Leuquina), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un modulador de receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un agente anti-maníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicación para el asma, un antagonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina. Los ejemplos no limitantes de tales citoquinas incluyen, pero sin limitación, cualquiera de IL-1 a IL-23. Las dosis adecuadas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al.*, Eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2ª Edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopeia, Taras-con Pharmacopeia 2000, Edición Deluxe, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000). Tales anti-cancerosos o anti-infectivos también pueden incluir moléculas de toxina que están asociadas, unidas, co-formuladas o que se co-administran con al menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina puede actuar opcionalmente para destruir selectivamente la célula o tejido patológico. La célula patológica puede ser una célula de cáncer u otra célula. Tales toxinas pueden ser, pero sin limitación, toxina o fragmento de toxina purificado o recombinante que comprende al menos un dominio citotóxico funcional de toxina, por ejemplo, seleccionada entre al menos una de toxina de ricina o difteria, una toxina de veneno o una toxina bacteriana. El término toxina también incluye tanto endotoxinas como exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus de origen natural, mutante o recombinante que puede causar cualquier proceso patológico en seres humanos y otros mamíferos, incluyendo choque por toxina, que puede dar como resultado la muerte. Tales toxinas pueden incluir, pero sin limitación, enterotoxina termolábil de *E. coli* enterotoxigénica (LT), enterotoxina termoestable (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, toxina 1 del síndrome choque tóxico (TSST-1), enterotoxina estafilocócica A (SEA), B (SEB) o C (SEC), enterotoxinas estreptocócicas y similares. Tales bacterias incluyen, pero sin limitación, cepas de una especie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (por ejemplo, cepas del serotipo 0157: H7), especies de *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies de *Campylobacter* (por ejemplo, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), especies de *Helicobacter*, (por

ejemplo, *Helicobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, especies de *Vibrios* (por ejemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococci*. Véase, por ejemplo, Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3ª edición, págs. 1 -13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans *et al*, eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2ª. Ed., págs. 239-254, Plenum Medical Book Co., Nueva York (1991); Mandelletal, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ª Ed., Churchill Livingstone, Nueva York (1990); Berkow *et al*, eds., The Merck Manual, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood *et al*, FEMS Microbiology Immunology, 76: 121-134 (1991); Marrack *et al*, Science, 248: 705-711 (1990).

Los compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpo anti-TNF de la presente invención pueden comprender además al menos uno de cualquier auxiliar adecuado, tales como, pero sin limitación, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes o similares. Se prefieren los auxiliares farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitantes de y los métodos de preparación de tales soluciones estériles se conocen bien en la técnica, tales como, pero sin limitación, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Se pueden seleccionar de forma rutinaria los vehículos farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad de la composición de anticuerpos anti-TNF como se conoce bien en la técnica o como se ha descrito en este documento.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di, tri, tetra y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que se pueden presentar de forma individual o en combinación, que comprenden solos o en combinación el 1-99,99% en peso o volumen. Los excipientes de proteína ilustrativos incluyen albúmina de suero tal como albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los componentes de aminoácido/anticuerpo representativos, que también pueden funcionar en una capacidad de tamponamiento, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Un aminoácido preferido es glicina.

Los excipientes de carbohidrato adecuados para uso en la invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes de carbohidrato preferidos para uso en la presente invención son manitol, trehalosa y rafinosa.

Las composiciones de anticuerpo anti-TNF también pueden incluir un tampón o un agente de ajuste de pH; típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánico. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones fosfato. Los tampones preferidos para uso en las presentes composiciones son sales de ácidos orgánicos tales como citrato.

Adicionalmente, las composiciones de anticuerpo anti-TNF de la invención pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinil pirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saporíferos, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos y ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

En la técnica se conocen estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos adecuados conocidos para su uso en las composiciones de anticuerpo anti-TNF de acuerdo con la invención, por ejemplo, como se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª Ed., Williams & Williams, (1995), y en el "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Los materiales de vehículo o excipiente preferidos son carbohidratos (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

Formulaciones

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona formulaciones estables, que preferiblemente son un tampón fosfato con solución salina o una sal elegida, así como soluciones y formulaciones conservadas que contienen un conservante así como formulaciones conservadas multi uso adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden al menos un anticuerpo anti-TNF en una formulación farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones conservadas contienen al menos un conservante conocido u opcionalmente se seleccionan entre el grupo que consiste en al menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito

fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, dehidroacetato sódico y timerosal o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Cualquier concentración adecuada o mezcla se puede usar como se conoce en la técnica, tal como el 0,001-5% o cualquier intervalo o valor dentro del mismo, tal como, pero sin limitación, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 o cualquier intervalo o valor dentro de los mismos. Los ejemplos no limitantes incluyen, sin conservante, m-cresol al 0,1-2% (por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9 ó 1,0%), alcohol bencílico del 0,1-3% (por ejemplo, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), timerosal del 0,001-0,5% (por ejemplo, 0,005, 0,01), fenol al 0,001-2,0% (por ejemplo, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), alquilparabenos del 0,0005-1,0% (por ejemplo, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) y similares.

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un artículo de fabricación, que comprende material de envasado y al menos un vial que comprende una solución de al menos un anticuerpo anti-TNF, con los tampones y/o conservantes prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que tal solución se puede mantener durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o mayor. La invención comprende además un artículo de fabricación, que comprende material de envasado, un primer vial que comprende al menos un anticuerpo anti-TNF liofilizado y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso de tampón o conservante prescrito, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que instruye a un paciente a reconstituir el al menos un anticuerpo anti-TNF en el diluyente acuoso para formar una solución que se puede mantener durante un periodo de veinticuatro horas o mayor.

El al menos un anticuerpo anti-TNF usado de acuerdo con la presente invención se puede producir mediante medios recombinantes, incluyendo a partir de preparaciones de células de mamífero o transgénicas o se puede purificar a partir de otras fuentes biológicas, como se ha descrito en este documento o como se conoce en la técnica.

El intervalo de al menos un anticuerpo anti-TNF en el producto de la presente invención incluye cantidades que producen tras la reconstitución, si están en un sistema húmedo/seco, concentraciones de aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 1000 mg/ml, aunque son funcionales las concentraciones menores y mayores y dependen del vehículo de administración deseado, por ejemplo, las formulaciones en solución diferirán de los métodos de parche transdérmico, pulmonar, transmucosal o de bomba osmótica o micro bomba.

Preferiblemente, el diluyente acuoso, opcionalmente comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. Los conservantes preferidos incluyen aquellos seleccionados entre el grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, dehidroacetato sódico y timerosal o mezclas de los mismos. Las concentraciones de conservante usadas en la formulación son una concentración suficiente para producir un efecto anti-microbiano. Tales concentraciones dependen del conservante seleccionado y se determinan fácilmente por el especialista.

Opcionalmente y preferiblemente, se pueden añadir al diluyente otros excipientes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, tampones, antioxidantes, conservantes y potenciadores. Un agente de isotonicidad, tal como glicerina, se usa comúnmente en concentraciones conocidas. Un tampón fisiológicamente tolerado se añade preferiblemente para proporcionar control de pH mejorado. Las formulaciones pueden abarcar un amplio intervalo de pH, tal como de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10 y los intervalos preferidos de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9 y un intervalo más preferido de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. Preferiblemente, las formulaciones de la presente invención tienen pH entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,8. Los tampones preferidos incluyen tampones fosfato, más preferiblemente fosfato sódico, particularmente solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Se pueden añadir otros aditivos a las formulaciones o composiciones, tales como solubilizantes farmacéuticamente aceptables como Tween 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán), Tween 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), Pluronic F68 (copolímeros de bloque de polioxietileno polioxipropileno) y PEG (polietilenglicol) o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 u 80 o poloxámero 184 ó 188, polioles de Pluronic®, otros copolímeros de bloque y quelantes tales como EDTA y EGTA, para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se usa una bomba o recipiente de plástico para administrar la formulación. La presencia de tensioactivo farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión de la proteína a formar agregados.

Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-TNF y un conservante seleccionado entre el grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares),

5 cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, dehidroacetato sódico y timerosal o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. La mezcla de al menos un anticuerpo anti-TNF y conservante en un diluyente acuoso se realiza usando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Por ejemplo, para preparar una formulación adecuada se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo anti-TNF en solución tamponada con el conservante deseado en una solución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el conservante en las concentraciones deseadas. Un especialista en la técnica reconocerá las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y los medios de administración usados.

10 Las formulaciones reivindicadas se pueden proporcionar a pacientes como soluciones transparentes o como viales dobles que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-TNF liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente un tampón fosfato y/o solución salina y una sal elegida, en un diluyente acuoso. Tanto un vial de solución única como un vial doble que requiere reconstitución se pueden reusar múltiples veces y pueden ser suficientes para un ciclo único o múltiples ciclos de tratamiento de paciente y, por tanto, pueden proporcionar un régimen de tratamiento más conveniente que los que están disponibles actualmente.

15 Los presentes artículos de fabricación reivindicados son útiles para administración a lo largo de un periodo de inmediatamente a veinticuatro horas o mayor. Por consiguiente, los presentes artículos de fabricación indicados ofrecen ventajas significativas al paciente. Las formulaciones de la invención opcionalmente se pueden almacenar de forma segura a temperaturas de aproximadamente 2 a aproximadamente 40°C y conservar la actividad biológica de la proteína durante periodos prolongados de tiempo, permitiendo de ese modo que una etiqueta de envase indique que la solución se puede mantener y/o usar durante un periodo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 o 96 horas o mayor. Si se usa diluyente conservado, tal etiqueta puede incluir el uso hasta 1-12 meses, medio, uno y medio y dos años.

20 Las soluciones de al menos un anticuerpo anti-TNF de la invención se pueden preparar mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. La mezcla se realiza usando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y opcionalmente un conservante o tampón en las concentraciones deseadas. Un especialista en la técnica reconocerá las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y medios de administración usados.

25 Los productos reivindicados se pueden proporcionar a pacientes como soluciones transparentes o como viales dobles que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-TNF liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. Tanto un vial de solución único como un vial doble que requiere reconstitución se pueden reusar múltiples veces y pueden ser suficientes para un ciclo único o múltiples ciclos de tratamiento de paciente y, de ese modo, proporciona un régimen de tratamiento más conveniente que los que están disponibles actualmente.

30 Los productos reivindicados se pueden proporcionar indirectamente a pacientes proporcionando a farmacias, clínicas u otras instituciones e instalaciones de este tipo, soluciones transparentes o viales dobles que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-TNF liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. En este caso, la solución transparente puede ser hasta un litro o incluso de mayor tamaño, proporcionando un recipiente grande a partir del cual partes pequeñas de la al menos una solución de anticuerpo se pueden recuperar una o múltiples veces para transferencia a viales más pequeños y proporcionados por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

35 Los dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de vial único incluyen los dispositivos de inyector de pluma para administración de una solución tal como BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® y OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, ijec®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, por ejemplo, como los preparados o desarrollados por Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Suiza, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, RU, www.weston-medical.com) y Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Los dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de vial doble incluyen los sistemas de inyector de pluma para reconstituir un fármaco liofilizado en un cartucho para administración de la solución reconstituida tal como el HumatroPen®.

40 Los productos reivindicados en este documento incluyen material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las cuales se puede usar el producto. El material de envasado de la presente invención proporciona instrucciones al paciente para

reconstituir el al menos un anticuerpo anti-TNF en el diluyente acuoso para formar una solución y para usar la solución a lo largo de un periodo de 2-24 horas o mayor para el producto de dos viales húmedo/seco. Para el producto de solución de vial único, la etiqueta indica que tal solución se puede usar a lo largo de un periodo de 2-24 horas o mayor. Los productos indicados en el presente documento son útiles para uso de producto farmacéutico humano.

Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-TNF y un tampón seleccionado, preferiblemente un tampón fosfato que contiene solución salina o una sal elegida. La mezcla de el al menos un anticuerpo y tampón en un diluyente acuoso se realiza usando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Por ejemplo, para preparar una formulación adecuada, una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón se combina con el agente tampón deseado en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y tampón en las concentraciones deseadas. Un especialista en la técnica reconocerá las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los cuales se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y medios de administración usados.

Las formulaciones estables o conservadas reivindicadas se pueden proporcionar a pacientes como soluciones transparentes o como viales dobles que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-TNF liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que contiene un conservante o un tampón y excipientes en un diluyente acuoso. Tanto un vial de solución única como un vial doble que requiere reconstitución se pueden reusar múltiples veces y pueden ser suficientes para un ciclo único o ciclos múltiples de tratamiento de paciente y, de este modo, proporcionan un régimen de tratamiento más conveniente que los que están disponibles actualmente.

Al menos un anticuerpo anti-TNF en las formulaciones o soluciones estables o conservadas descritas en este documento, se puede administrar a un paciente de acuerdo con la presente invención a través de una diversidad de métodos de administración incluyendo inyección SC o IM; por vía transdérmica, pulmonar, transmucosal, implante, bomba osmótica, cartucho, micro bomba u otros medios apreciados por los especialistas, como se conoce bien en la técnica.

Aplicaciones Terapéuticas

El anticuerpo o composición de la invención puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con TNF, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, como se conoce en la técnica o como se ha descrito en este documento.

En particular, los mismos pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con TNF en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero sin limitación, al menos uno de obesidad, una enfermedad relacionada con el sistema inmune, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad maligna o una enfermedad neurológica.

Más específicamente, los mismos pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con el sistema inmune, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero sin limitación, al menos uno de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, procedimientos de inversión de orquitis/vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis por contacto alérgica, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo de trasplantes de órganos, enfermedad de injerto frente a hospedador, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis por gram positivos, sepsis por gram negativos, sepsis de cultivo negativo, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococemia, trauma/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de estrés respiratorio adulto, artritis reumatoide, hepatitis inducida por alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia de células falciformes, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones de hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxis sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo del trasplante de riñón, rechazo de trasplante de corazón, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de páncreas, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), rechazo de aloinjerto de piel, rechazo de trasplante de cartilago, rechazo de injerto de hueso, rechazo de trasplante de intestino delgado, rechazo de implante de timo fetal, rechazo de trasplante de paratiroides, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynoud, diabetes resistente a insulina de tipo B, asma, miastenia grave, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, síndrome de cambio de piel, síndrome antifosfolípido, pénfigo, esclerodermia, enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad de Addison

idiopática, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitíligo, vasculitis, síndrome de cardiotomía post-MI, hipersensibilidad de tipo IV, dermatitis por contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjerto, granulomas debidos a organismos intracelulares, sensibilidad a fármacos, metabólica/idiopática, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia de alfa 1 antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomiелitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), linfocitosis hematofagocítica familiar, afecciones dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, terapia con okt3, terapia anti-cd3, terapia de citoquina, quimioterapia, terapia de radiación (por ejemplo, incluyendo pero sin limitación, astenia, anemia, caquexia y similares), intoxicación por salicilato crónica y similares. Véase, por ejemplo, Merck Manual, 12^a-17^a Ediciones, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al.*, eds., Segunda Edición, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

El anticuerpo o composición de la invención puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero sin limitación, al menos una de síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, apoplejía isquémica, hemorragia, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad arteriosclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, choque, sífilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardíaca, cor pulmonale, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latido ectópico auricular, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), síndrome post perfusión, respuesta de inflamación a derivación cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia regular con QRS estrecho, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias del haz de His, bloqueo auriculoventricular, bloqueo de la rama del haz, trastornos isquémicos miocárdicos, arteriopatía coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada, cardiomiopatía restrictiva, enfermedades cardíacas valvulares, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardíacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad aterosclerótica periférica, tromboangitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales, fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, venas varicosas, fístula arteriovenosa, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión de reperfusión, síndrome post bomba, lesión por isquemia-reperfusión y similares.

El anticuerpo o composición de la invención puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo pero sin limitación, al menos una de: infección bacteriana aguda o crónica, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, incluyendo infecciones bacterianas, virales y fúngicas, infección por VIH/neuropatía por VIH, meningitis, hepatitis (A, B o C o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, *E. coli* 0157: h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, malaria, fiebre de dengue hemorrágico, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena del gas, tuberculosis por *mycobacterium*, *mycobacterium avium* intracelular, neumonía por *pneumocystis carinii*, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionella, enfermedad de Lyme, influenza A, virus de Epstein-Barr, síndrome hemafagocítico asociado vital, encefalitis vital/meningitis aséptica y similares.

El anticuerpo o composición de la invención puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo pero sin limitación, al menos uno de: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL de células B, células T o FAB, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células vellosas, síndrome mielodisplásico (MDS), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con cáncer, dolor óseo relacionado con cáncer y similares.

El anticuerpo o composición de la invención puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo pero sin limitación, al menos una de: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, dolor de cabeza de migraña, complejo de demencia del SIDA, enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple y mielitis transversa aguda, trastornos extrapiramidales y cerebelares tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelares; trastornos de movimiento hiperkinético tales como Corea de Huntington y corea senil; trastornos de movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos de movimiento hipocinético, tales como enfermedad de Parkinson; Parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager y Machado-Joseph); trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia y trastorno de sistema múltiple mitocondrial); trastornos de núcleo

desmielinizante, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversal aguda; y trastornos de la unidad motora tales como atrofas musculares neurogénicas (degeneración de células del cuerno anterior, tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down en edad media; enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, Demencia Senil de tipo de cuerpo de Lewy; 5 síndrome de Wernicke-Korsakoff, alcoholismo crónico, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallerrorden- Spatz y Demencia pugilística y similares. Véase, por ejemplo, the Merck Manual, 16ª edición, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

La composición de la invención se puede usar en un método que comprende administrar una cantidad 10 eficaz a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que la necesita. Un método de este tipo puede opcionalmente comprender además la co-administración o terapia de combinación para tratar tales enfermedades inmunes, en las que la administración de dicha composición comprende además administrar, antes, simultáneamente y/o después al menos uno seleccionado entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero sin limitación, un anticuerpo de TNF o fragmento, un receptor de TNF soluble o fragmento, proteínas de fusión del mismo o un antagonista de TNF 15 de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida y sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglicósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, una cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina u otros antimicrobianos), un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabolizante, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un agente nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leuquina), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por 20 ejemplo, basiliximab, ciclosporina y daclizumab), una hormona del crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un modulador de receptor de estrógeno, un agente midriático, un ciclopéptico y un alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina. Las dosis adecuadas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al.*, eds., Pharmacotherapy Handbook, 2ª Edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Edición Deluxe, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Los antagonistas de TNF adecuados para composiciones, terapia de combinación, co-administración, dispositivos y/o métodos de la presente invención (comprendiendo además al menos un anticuerpo, parte 35 especificada y variante del mismo, de la presente invención), incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-TNF, fragmentos de unión a antígeno del mismo y moléculas receptoras que se unen específicamente a TNF; los compuestos que evitan y/o inhiben la síntesis de TNF, liberación de TNF o su acción en células diana, tales como talidomida, tenidap, inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas de receptor de adenosina A2b y potenciadores de receptor de adenosina A2b; compuestos que evitan y/o inhiben la señalización del receptor de TNF, tales como inhibidores de proteína quinasa activada por mitógeno (MAP); compuestos que bloquean o inhiben la escisión de TNF de membrana, tales como inhibidores de metaloproteinasas; compuestos que bloquean o inhiben la actividad de TNF, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por 40 ejemplo, captopril) y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o síntesis de TNF, tales como los inhibidores de MAP quinasa.

Como se usa en este documento, un "anticuerpo de factor de necrosis tumoral", "anticuerpo de TNF", "anticuerpo de TNF α " o fragmento y similares disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad de TNF α 50 *in vitro*, *in situ* y/o preferiblemente *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo humano TNF adecuado de la presente invención se puede unir a TNF α e incluye anticuerpos anti-TNF, fragmentos de unión a antígeno del mismo y mutantes especificados o dominios del mismo que se unen específicamente a TNF α . Un anticuerpo de TNF o fragmento adecuado también puede disminuir, bloquear, anular, interferir, evitar y/o inhibir la síntesis de ARN, ADN o proteína de TNF, la liberación de TNF, la señalización de receptor de TNF, la escisión de TNF en membrana, la actividad de TNF y la producción y/o síntesis de TNF.

El anticuerpo quimérico cA2 consiste en la región variable de unión a antígeno del anticuerpo anti-IgG1 de TNF α humano de ratón neutralizante de afinidad alta, denominado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina kappa IgG1 humana. La región Fc de IgG1 humana mejora la función efectora de anticuerpo alogénico, aumenta la semivida en suero circulante y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y especificidad de epítipo del anticuerpo quimérico cA2 se obtiene de la región variable del anticuerpo murino A2. En una realización particular, una fuente preferida de ácidos nucleicos que codifican la región variable del anticuerpo murino A2 es la línea de células de hibridoma A2.

El A2 quimérico (cA2) neutraliza el efecto citotóxico de TNF α humano tanto natural como recombinante de

una manera dependiente de la dosis. A partir de ensayos de unión de anticuerpo quimérico cA2 y TNF α humano recombinante, se calculó que la constante de afinidad del anticuerpo quimérico cA2 era $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Los métodos preferidos para determinar la especificidad y afinidad del anticuerpo monoclonal mediante inhibición competitiva se pueden observar en Harlow, *et al.*, antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Colligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc, y Wiley Interscience, Nueva York, (1992-2000); Kozbor *et al.*, Immunol. Today, 4: 72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York (1987-2000); y Muller, Meth. Enzymol., 92: 589-601 (1983).

En una realización preferida, se produce anticuerpo monoclonal murino A2 por una línea celular denominada c134A. El anticuerpo quimérico cA2 se produce por una línea celular denominada c168A.

Los ejemplos adicionales de anticuerpos anti-TNF monoclonales que se pueden usar en la presente invención se describen en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.231.024; Moller, A. *et al.*, Cytokine 2(3): 162-169 (1990); Solicitud de Estados Unidos N° 07/943.852 (presentada el 11 de septiembre de 1992); Rathjen *et al.*, Publicación Internacional N° WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991); Rubin *et al.*, Publicación de Patente EPO N° 0 218 868 (publicada el 22 de abril de 1987); Yone *et al.*, Publicación de Patente EPO N° 0288 088 (26 de octubre de 1988); Liang, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137: 847-854(1986); Meager, *et al.*, Hybridoma 6: 305-311 (1987); Fendly *et al.*, Hybridoma 6: 359-369 (1987); Bringman, *et al.*, Hybridoma 6: 489-507 (1987); y Hirai, *et al.*, J. Immunol. Meth. 96: 57-62 (1987).

Moléculas receptoras de TNF

Las moléculas receptoras de TNF preferidas útiles en la presente invención son aquellas que se unen a TNF α con afinidad alta (véase, por ejemplo, Feldmann *et al.*, Publicación Internacional N° WO 92/07076 (publicada el 30 de abril de 1992); Schall *et al.*, Cell 61: 361-370 (1990), y Loetscher *et al.*, Cell 61:351-359 (1990), cuyas referencias se incorporan en este documento en su totalidad como referencia) y opcionalmente poseen inmunogenicidad baja. En particular, los receptores de superficie celular de TNF de 55 kDa (p55 TNF-R) y el de 75 kDa (p75 TNF-R) son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares (ECD) de los receptores o partes funcionales de los mismos (véase, por ejemplo, Corcoran *et al.*, Eur. J. Biochem. 223: 831-840 (1994)), también son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de los receptores de TNF, que comprenden los ECD, también se han detectado en orina y suero como proteínas de unión inhibitoras de TNF α de 30 kDa y 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 1531-1536 (1990). Las moléculas multiméricas receptoras de TNF y moléculas de fusión de inmunorreceptor de TNF y derivados y fragmentos o partes de las mismas, son ejemplos adicionales de moléculas receptoras de TNF que son útiles en los métodos y composiciones de la presente invención. Las moléculas receptoras de TNF que se pueden usar en la invención se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante periodos prolongados con alivio de bueno a excelente de síntomas y toxicidad baja. La inmunogenicidad baja y/o afinidad alta, así como otras propiedades indefinidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos.

Las moléculas multiméricas receptoras de TNF útiles en la presente invención comprenden toda o una parte funcional de los ECD de dos o más receptores de TNF unidos a través de uno o más enlazadores polipeptídicos u otros enlazadores no peptídicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las moléculas multiméricas pueden comprender además un péptido señal de una proteína secretada para dirigir la expresión de una molécula multimérica.

Las moléculas de fusión de inmunorreceptor de TNF útiles en los métodos y composiciones de la presente invención comprenden al menos una parte de una o más moléculas de inmunoglobulina y todo o una parte funcional de uno o más receptores de TNF. Estas moléculas de fusión de inmunorreceptor se pueden ensamblar como monómeros o hetero u homo-multímeros. Las moléculas de fusión de inmunorreceptor también pueden ser monovalentes o multivalentes. Un ejemplo de una molécula de fusión de inmunorreceptor de TNF de este tipo es la proteína de fusión de receptor de TNF/IgG. Las moléculas de fusión de inmunorreceptor de TNF y los métodos para su producción se han descrito en la técnica (Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. 21: 2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, J. Exp. Med. 174: 1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215-219 (1994); Butler *et al.*, Cytokine 6(6): 616-623 (1994); Baker *et al.*, Eur. J. Immunol. 24: 2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.447.851; y Solicitud de los Estados Unidos N° 08/442.133 (presentada el 16 de mayo de 1995). Los métodos para producir moléculas de fusión de inmunorreceptor también se pueden encontrar en Capon *et al.*, Patentes de Estados Unidos N° 5.116.964; Capon *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.225.538; y Capon *et al.*, Nature 337: 525-531 (1989).

Un equivalente funcional, derivado, fragmento o región de molécula receptora de TNF se refiere a la parte de la molécula receptora de TNF o la parte de la secuencia de la molécula receptora de TNF que codifica la molécula receptora de TNF, que tiene un tamaño y secuencias suficientes para parecerse funcionalmente a las moléculas receptoras de TNF que se pueden usar en la presente invención (por ejemplo, se unen a TNF con afinidad alta y poseen inmunogenicidad baja). Un equivalente funcional de la molécula receptora de TNF también

incluye moléculas receptoras de TNF modificadas que funcionalmente se parecen a moléculas receptoras de TNF que se pueden usar en la presente invención (por ejemplo, se unen a TNF con afinidad alta y poseen inmunogenicidad baja). Por ejemplo, un equivalente funcional de una molécula receptora de TNF puede contener un codón "SILENTE" o una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido (por ejemplo, sustitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido; o sustitución de un codón que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido hidrófobo diferente por otro codón que codifica un aminoácido hidrófobo). Véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley-Interscience, Nueva York (1987-2000).

Las citoquinas incluyen cualquier citoquina conocida. Véase, por ejemplo, CopewithCytokines.com. Los antagonistas de citoquina incluyen, pero sin limitación, cualquier anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier receptor soluble, fragmento o mimético, cualquier antagonista de molécula pequeña o cualquier combinación de los mismos.

Tratamientos Terapéuticos. La composición de la invención se puede usar en un método para tratar un trastorno mediado por TNF, que comprende administrar una cantidad eficaz a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que la necesita. Un método de este tipo puede además comprender opcionalmente la co-administración o terapia de combinación para tratar tales enfermedades inmunes, en las que la administración de dicha composición, comprende además administrar, antes, simultáneamente y/o después, al menos uno seleccionado entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero sin limitación, un anticuerpo de TNF o fragmento, un receptor de TNF o fragmento soluble, proteínas de fusión de los mismos o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxicloroquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglicósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una flurorquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina u otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabolizante, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un agente nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antiarritmico, un antitussivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leuquina), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un modulador del receptor de estrógeno, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina.

Típicamente, el tratamiento de procesos patológicos se logra administrando una cantidad o dosificación eficaz de al menos una composición de anticuerpo anti-TNF que totaliza, en promedio, un intervalo de al menos aproximadamente 0,01 a 500 miligramos de al menos un anticuerpo anti-TNF por kilogramo de paciente por dosis y, preferiblemente, de al menos aproximadamente 0,1 a 100 miligramos de anticuerpo/kilogramo de paciente por administración única o múltiple, dependiendo de la actividad específica contenida en la composición. Como alternativa, la concentración en suero eficaz puede comprender 0,1-5000 µg/ml de concentración en suero por administración única o múltiple. Los facultativos médicos conocen las dosis adecuadas y, por supuesto, dependerán de la patología particular, de la actividad específica de la composición que se esté administrando y del paciente particular que se esté sometiendo al tratamiento. En algunos casos, para conseguir la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario proporcionar administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis controlada o medida particular, donde las administraciones individuales se repiten hasta que se consigue la dosis diaria o el efecto deseados.

Las dosis preferidas opcionalmente pueden incluir 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/ administración, o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos o para conseguir una concentración en suero de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1,1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9,20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5,, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 y/o 5000 µg/ml de concentración en suero por administración única o múltiple, o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos.

Como alternativa, la dosis administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; edad, salud y peso del

receptor; naturaleza y alcance de los síntomas, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. Habitualmente, una dosis de ingrediente activo puede ser de aproximadamente 0,1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. Normalmente de 0,1 a 50 y preferiblemente de 0,1 a 10 miligramos por kilogramo por administración o en forma de liberación sostenida son eficaces para obtener los resultados deseados.

5 Como un ejemplo no limitante, el tratamiento de seres humanos o animales se puede proporcionar como una dosis de una sola vez o periódica de al menos un anticuerpo de la presente invención de 0,1 a 100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/kg, por día, en al menos en uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 o, como alternativa o adicionalmente, al menos uno de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 ó 52 o, como alternativa o adicionalmente, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 años o cualquier combinación de los mismos, usando dosis única, de infusión o repetidas.

15 Las formas farmacéuticas (composición) adecuadas para administración interna en general contienen de aproximadamente 0,1 miligramo a aproximadamente 500 miligramos de ingrediente activo por unidad o recipiente. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo normalmente estará presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5-99,999% en peso basándose en el peso total de la composición.

20 Para administración parenteral, el anticuerpo se puede formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación o proporcionado por separado, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 1-10%. Los liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles también se pueden usar. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio y manitol) y estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas conocidas o adecuadas.

25 Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia convencional en este campo.

Administración Alternativa

30 Se pueden usar muchos modos conocidos y desarrollados de acuerdo con la presente invención para administrar cantidades farmacéuticamente eficaces de al menos un anticuerpo anti-TNF de acuerdo con la presente invención. Aunque se usa administración pulmonar en la siguiente descripción, se pueden usar otros modos de administración de acuerdo con la presente invención con resultados adecuados.

35 Los anticuerpos de TNF de la presente invención se pueden administrar en un vehículo, como una solución, emulsión, coloide o suspensión, o como un polvo seco, usando cualquiera de una diversidad de dispositivos y métodos adecuados para administración mediante inhalación u otros modos descritos en este documento o conocidos en la técnica.

Formulaciones Parenterales y Administración

40 Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua estéril o solución salina, polialquilen glicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las suspensiones acuosas u oleosas para inyección se pueden preparar usando un emulsionante o humectante apropiado y un agente de suspensión, de acuerdo con métodos conocidos. Los agentes para inyección pueden ser un agente diluyente no tóxico, no administrable por vía oral, tal como solución acuosa o una solución o suspensión inyectable estéril en un disolvente. Como el vehículo o disolvente que se puede usar, se permiten agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc.; como un disolvente ordinario o disolvente de suspensión, se puede usar aceite no volátil estéril. Para estos propósitos, se puede usar cualquier tipo de aceite y ácido graso no volátil, incluyendo aceites grasos o ácidos grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; mono o di o triglicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parenteral se conoce en la técnica e incluye, pero sin limitación, medios convencionales de inyecciones, un dispositivo de inyección sin aguja a gas presurizado como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.851.198 y un dispositivo perforador láser como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.839.446 incorporada en su totalidad en la presente por referencia.

Administración Alternativa

45 La invención se refiere además a la administración de al menos un anticuerpo anti-TNF mediante medios parenterales, subcutáneos, intramusculares, intravenosos, intrarticulares, intrabronquiales, intraabdominales, intracapsulares, intracartilaginosos, intracavitarios, intraceliales, intracerebelares, intracerebroventriculares, intracólicos, intracervicales, intragástricos, intrahepáticos, intramiocárdicos, intraóseos, intrapélvicos,

5 intrapericardiacos, intraperitoneales, intrapleurales, intraprostáticos, intrapulmonares, intrarrectales, intrarrenales, intrarretinianos, intraespinales, intrasinoviales, intratorácicos, intrauterinos, intravesicales, de bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico. Al menos una composición de anticuerpo anti-TNF se puede preparar para uso para administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o de cualquier otro tipo, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para uso en administración vaginal o rectal, particularmente en formas semisólidas, tales como, pero sin limitación, cremas y supositorios; para administración bucal o sublingual tales como, pero sin limitación, en forma de comprimidos o cápsulas; o por vía intranasal, tal como, pero sin limitación, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles o determinados agentes; o por vía transdérmica, tal como, pero sin limitación, un gel, pomada, loción, suspensión o sistema de administración por parche con potenciadores químicos tales como dimetilsulfóxido para modificar la estructura de la piel o para aumentar la concentración de fármaco en el parche transdérmico (Junginger, *et al.*, In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., págs. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. Nueva York 1994, que se incorpora en su totalidad en este documento como referencia), o con agentes oxidantes que permiten la aplicación de formulaciones que contienen proteínas y péptidos sobre la piel (el documento WO 98/53847) o aplicaciones de campos eléctricos para crear rutas de transporte transitorias tales como electroporación o para aumentar la movilidad de fármacos cargados a través de la piel tales como iontoforesis o aplicación de ultrasonido tal como sonoforesis (Patentes de Estados Unidos N° 4.309.989 y 4.767.402).

20 Administración Pulmonar/Nasal

25 Para administración pulmonar, preferiblemente al menos una composición de anticuerpos anti-TNF se administra en un tamaño de partícula eficaz para alcanzar las vías respiratorias inferiores de los pulmones o de los senos. De acuerdo con la invención, al menos un anticuerpo anti-TNF se puede administrar mediante cualquiera de una diversidad de dispositivos de inhalación o nasales conocidos en la técnica para administración de un agente terapéutico mediante inhalación. Estos dispositivos capaces de depositar formulaciones aerosolizadas en la cavidad sinusal o los alvéolos de un paciente incluyen inhaladores de dosis medida, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. Otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de anticuerpos también se conocen en la técnica. Todos estos dispositivos pueden usar formulaciones adecuadas para la administración para el reparto de anticuerpo en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar comprendidos de soluciones (tanto acuosas como no acuosas) o partículas sólidas. Los inhaladores de dosis medida como el inhalador de dosis medida Ventolin®, típicamente usan un gas propulsor y requieren el accionamiento durante la inspiración (Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/16970 y WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco como Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics y el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), usan el accionamiento por respiración de un polvo mixto (los documentos U.S. 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 35 94/08552 Dura, U.S. 5458135 Inhala, WO 94/06498 Fisons, que se incorporan en su totalidad en este documento como referencia). Los nebulizadores como AERx™ Aradigm, el nebulizador UltraVent® (Mallinckrodt) y el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products) (los documentos U.S. 5404871 Aradigm y WO 97/22376), estando las referencias anteriores incorporadas en este documento en su totalidad como referencia, producen aerosoles a partir de soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco, etc. 40 generan aerosoles de partícula pequeña. Estos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles en el mercado tienen por objeto ser una representación de dispositivos específicos adecuados para la práctica de esta invención y no tiene por objeto limitar el alcance de la invención. Preferiblemente, una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-TNF se administra mediante un inhalador un pulverizador de polvo seco. Existen varias características deseables de un dispositivo de inhalación para administrar al menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la administración mediante el dispositivo de inhalación es provechosamente fiable, reproducible y precisa. El dispositivo de inhalación opcionalmente puede administrar partículas secas pequeñas, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 µm, preferiblemente aproximadamente 1-5 µm, para buena respirabilidad.

50 Administración de Composiciones de Anticuerpo de TNF como una Pulverización

55 Una pulverización que incluye proteína de composición de anticuerpo de TNF se puede producir forzando una suspensión o solución de al menos un anticuerpo anti-TNF a través de una boquilla bajo presión. El tamaño y la configuración de la boquilla, la presión aplicada y el índice de alimentación de líquido se pueden elegir para conseguir la producción y el tamaño de partícula deseado. Se puede producir una electropulverización, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con una alimentación capilar o por boquilla. Provechosamente, las partículas de al menos una proteína de composición de anticuerpo anti-TNF administradas mediante un pulverizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 µm, preferiblemente en el intervalo de 60 aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm y más preferiblemente de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 3 µm.

65 Las formulaciones de al menos una proteína de composición de anticuerpo anti-TNF adecuadas para su uso con un pulverizador típicamente incluyen proteína de composición de anticuerpo a una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de al menos una proteína de composición

de anticuerpo anti-TNF por ml de solución o mg/g o cualquier intervalo o valor dentro de los mismos, por ejemplo, pero sin limitación, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/ml o mg/g. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensioactivo y, preferiblemente, cinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para estabilización de la proteína de composición de anticuerpo, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína de volumen o un carbohidrato. Las proteínas de volumen útiles en la formulación de proteínas de composición de anticuerpo incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos típicos útiles en la formulación de proteínas de composición de anticuerpo incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La formulación de proteína de composición de anticuerpo también puede incluir un tensioactivo, que pueden reducir o evitar la agregación inducida por superficie de la proteína de composición de anticuerpo causada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Se pueden emplear diversos tensioactivos convencionales, tales como ésteres y alcoholes de ácido graso de polioxietileno y ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitol. Las cantidades generalmente variarán entre el 0,001 y el 14% en peso de la formulación. Los tensioactivos especialmente preferidos para los propósitos de esta invención son monooleato de polioxietileno sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20 o similares. Los agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína tal como anticuerpos de TNF o partes o variantes especificadas, también se pueden incluir en la formulación.

Administración de Composiciones de Anticuerpo de TNF Mediante un Nebulizador

Se puede administrar proteína de composición de anticuerpo mediante un nebulizador, tal como un nebulizador por compresión o un nebulizador ultrasónico. Típicamente, en un nebulizador por compresión, se usa una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire de alta velocidad a través de un orificio. A medida que el gas se expande más allá de la boquilla, se crea una región de presión baja, que atrae una solución de proteína de composición de anticuerpo a través de un tubo capilar conectado a un depósito de líquido. El chorro de líquido desde el tubo capilar se rompe en filamentos y gotas inestables a medida que sale del tubo, creando el aerosol. Se pueden emplear una variedad de configuraciones, caudales y tipos de tabiques deflectores para conseguir las características de rendimiento deseadas a partir de un nebulizador por compresión dado. En un nebulizador ultrasónico, se usa energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía mecánica vibracional, empleando típicamente un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la formulación de proteína de composición de anticuerpo directamente o a través de un líquido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la proteína de composición de anticuerpo. Provechosamente, las partículas de proteína de composición de anticuerpo administradas mediante un nebulizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 μm , preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm y más preferiblemente de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 3 μm .

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-TNF adecuadas para uso con un nebulizador, ya sea por compresión o ultrasónico, típicamente incluyen una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de al menos una proteína de anticuerpo anti-TNF por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensioactivo y, preferiblemente, cinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para estabilización de la al menos una proteína de composición de anticuerpo anti-TNF, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína de volumen o un carbohidrato. Las proteínas de volumen útiles para formular al menos una proteína de composición de anticuerpo anti-TNF incluyen albúmina, protamina y similares. Los carbohidratos típicos útiles para formular al menos un anticuerpo anti-TNF incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La al menos una formulación de anticuerpo anti-TNF también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o evitar la agregación inducida por superficie del al menos un anticuerpo anti-TNF causada por la pulverización de la solución en la formación de un aerosol. Se pueden emplear diversos tensioactivos convencionales, tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietileno y alcoholes y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán. Las cantidades generalmente variarán entre el 0,001 y el 4% en peso de la formulación. Los tensioactivos especialmente preferidos para los propósitos de esta invención son monooleato de polioxietileno sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20 o similares. Los agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína tal como una proteína de anticuerpo también se pueden incluir en la formulación.

Administración de Composiciones de Anticuerpo de TNF mediante un Inhalador de Dosis Medida.

En un inhalador de dosis medida (MDI), están contenidos un propulsor, al menos un anticuerpo anti-TNF y cualquiera de excipientes u otros aditivos en un cartucho como una mezcla que incluye un gas comprimido licuado. El accionamiento de la válvula de medición libera la mezcla como un aerosol, preferiblemente que contiene partículas en el intervalo de tamaño de menos de aproximadamente 10 μm , preferiblemente aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm y más preferiblemente aproximadamente 2 μm a aproximadamente 3 μm . El tamaño de partícula de aerosol deseado se puede obtener empleando una formulación de proteína de composición de anticuerpo producida por diversos métodos conocidos por los especialistas en la técnica, incluyendo molienda a chorro, secado por pulverización, condensación de punto crítico o similares. Los inhaladores de dosis medida preferidos incluyen los fabricados por 3M o Glaxo y que emplean un propulsor de hidrofluorocarbono.

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-TNF para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente incluirán un polvo dividido finamente que contiene al menos un anticuerpo anti-TNF como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendido en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado con este propósito, tal como clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidroc fluorocarbono o un hidrocarbano, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, dichlorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227) o similares. Preferiblemente, el propulsor es un hidrofluorocarbono. El tensioactivo se puede elegir para estabilizar el al menos un anticuerpo anti-TNF como una suspensión en el propulsor, para proteger el agente activo frente a la degradación química y similares. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán, lecitina de soja, ácido oleico o similares. En algunos casos, se prefieren aerosoles de solución que usan disolventes tales como etanol. En la formulación también se pueden incluir agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tales como proteína.

Un especialista en la técnica reconocerá que los métodos de la presente invención se pueden conseguir mediante administración pulmonar de al menos una composición de anticuerpo anti-TNF a través de dispositivos no descritos en este documento.

Formulaciones Orales y Administración

Las formulaciones para administración oral dependen de la coadministración de adyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y tensoactivos no iónicos tales como polioxietilen oleil éter y n-hexadecilpolietilen éter) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la coadministración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática. El compuesto constituyente activo de la forma farmacéutica de tipo sólido para administración oral puede mezclarse con al menos un aditivo, incluyendo sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidones, agar, arginatos, quitinas, quitosanas, pectinas, goma de tragacanto, goma arábica, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímero sintético o semisintético y glicérido. Estas formas farmacéuticas también pueden contener otros tipos de aditivos, por ejemplo, agente diluyente inactivo, lubricante tal como estearato de magnesio, parabeno, agente conservante tal como ácido sórbico, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, antioxidante tal como cisteína, disgregante, aglutinante, espesante, agente tamponante, agente edulcorante, agente saporífero, agente perfumante, etc.

Los comprimidos y píldoras se pueden procesar adicionalmente en preparaciones con recubrimiento entérico. Las preparaciones líquidas para administración oral incluyen preparaciones de emulsión, jarabe, elixir, suspensión y solución que se pueden usar para uso médico. Estas preparaciones pueden contener agentes diluyentes inactivos usados normalmente en dicho campo, por ejemplo, agua. Los liposomas también se han descrito como sistemas de administración de fármacos para insulina y heparina (Patente de Estados Unidos N° 4.239.754). Más recientemente, se han usado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (proteinoides) para administrar agentes farmacéuticos (Patente de Estados Unidos N° 4.925.673). Además, se conocen en la técnica los compuestos de vehículo descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.879.681 y 5.871.753 se usan para administrar agentes biológicamente activos por vía oral.

Formulaciones y Administración Mucosa

Para absorción a través de superficies de la mucosa, las composiciones y métodos de administración de al menos un anticuerpo anti-TNF incluyen una emulsión que comprende una pluralidad de partículas submicrométricas, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo y una fase continua acuosa, que promueve la absorción a través de las superficies de las mucosas consiguiendo la mucoadhesión de las partículas de emulsión (Patente de Estados Unidos N° 5.514.670). Las superficies mucosas adecuadas para aplicación de las emulsiones de la presente invención pueden incluir las vías de administración corneal, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal y rectal. Las formulaciones para administración vaginal o rectal, por ejemplo, supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquilenglicoles, vaselina, manteca de cacao y similares. Las formulaciones para administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas u oleosas de gotas nasales. Para administración bucal los excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado y similares (Patente de Estados Unidos N° 5.849.695).

Formulaciones y Administración Transdérmica

Para administración transdérmica, el al menos un anticuerpo anti-TNF se encapsula en un dispositivo de administración tal como un liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartículas, microcápsulas o microesferas (denominadas colectivamente como micropartículas a menos que se indique de otra manera). Se conocen varios dispositivos adecuados, incluyendo micropartículas hechas de polímeros sintéticos tales como polihidroxiácidos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos y

polifosfacenos y polímeros naturales tales como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos y combinaciones de los mismos (Patente de Estados Unidos N° 5.814.599).

Administración Prolongada y Formulaciones

5 Algunas veces puede ser deseable administrar los compuestos de la presente invención al sujeto durante periodos de tiempo prolongados, por ejemplo, durante periodos de una semana a un año a partir de una administración única. Se pueden utilizar diversas formas farmacéuticas de liberación lenta, prolongada o de implante. Por ejemplo, una forma farmacéutica puede contener una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica de los compuestos que tiene un bajo grado de solubilidad en los líquidos corporales, por ejemplo, (a) una sal de adición de ácido con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido alginico, ácido poliglutámico, ácidos mono- o di-sulfónicos de naftaleno, ácido poligalacturónico y similares; (b) una sal con un catión metálico polivalente tal como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares o con un catión orgánico formado a partir de, por ejemplo, N,N'-dibencil-etilendiamina o etilendiamina; (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo, una sal de tanato de cinc. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención o, preferiblemente, una sal relativamente insoluble tal como las que se acaban de describir, se pueden formular en un gel, por ejemplo, un gel de monoestearato de aluminio, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para inyección. Las sales particularmente preferidas son las sales de cinc, sales de tanato de cinc, sales de pamoato y similares. Otro tipo de formulación de liberación lenta prolongada para inyección podría contener el compuesto o sal dispersado para encapsularse en un polímero de degradación lenta, no tóxico, no antigénico tal como un polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 3.773.919. Los compuestos o, preferiblemente, sales relativamente insolubles tales como las que se han descrito anteriormente también se pueden formular en gránulos silásticos de matriz de colesterol, particularmente para uso en animales. En la bibliografía se conocen formulaciones de liberación lenta, prolongada o de implante adicionales, por ejemplo, liposomas de gas o líquido (Patente de Estados Unidos N° 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N. Y. 19778).

Habiendo descrito la invención en general, la misma se apreciará más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no tienen por objeto ser limitantes.

Ejemplo 1: Clonación y Expresión de anticuerpo de TNF en Células de Mamífero

Un vector de expresión de mamífero típico contiene al menos un elemento promotor, que media el inicio de la transcripción de ARNm, la secuencia codificante de anticuerpo y señales necesarias para la terminación de transcripción y poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores para corte y empalme de ARN. La transcripción altamente eficaz se puede conseguir con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTRS) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden usar elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano). Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, o pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) o pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Las células huésped de mamífero que se podrían usar incluyen células Hela 293, H9 y de Jurkat, células NIH3T3 y C127 de ratón, células Cos 1, Cos 7 y CV 1, células quail QC1-3, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Como alternativa, el gen se puede expresar en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La cotransfección con un marcador de selección tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado también se puede amplificar para expresar grandes cantidades del anticuerpo codificado. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintetasa (GS) (Murphy, *et al.*, Biochem. J. 227: 277-279) (1991); Bebbington, *et al.*, Bio/Technology 10: 169-175 (1992)). Usando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el gen o los genes amplificados integrados en un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO se usan con frecuencia para la producción de anticuerpos.

Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen, *et al.*, Molec. Cell. Biol. 5: 438-447 (1985)) más un fragmento del potenciador de CMV (Boshart, *et al.*, Cell 41: 521-530 (1985)). Múltiples sitios de clonación, por ejemplo, con los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el intrón 3', la señal de poliadenilación y terminación del gen de preproinsulina de la rata.

Clonación y Expresión en Células CHO

5 El vector pC4 se usa para la expresión de anticuerpo de TNF. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (Nº de acceso de la ATCC 37146). El plásmido contiene el gen de DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40. Las células de ovario de hámster chino u otras células que carecen de actividad de dihidrofolato que se transfectan con estos plásmidos se pueden seleccionar cultivando las células en un medio selectivo (por ejemplo, alfa-MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes de DHFR en las células resistentes a metotrexato (MTX) se ha documentado bien (véase, por ejemplo, F. W. Alt, *et al.*, J. Biol. Chem. 253: 1357-1370 (1978); J. L. Hamlin L y C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097: 107-143 (1990) y M. J. Page y M. A. Sydenham, Biotechnology 9: 64-68 (1991)). Las células cultivadas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al fármaco mediante la superproducción de la enzima diana, DHFR, como resultado de la amplificación del gen de DHFR. Si se une un segundo gen al gen de DHFR, habitualmente se coamplifica y se sobreexpresa. En la técnica se conoce que este enfoque se puede usar para desarrollar líneas celulares que portan más de 1.000 copias del gen o los genes amplificados. Posteriormente, cuando se retira el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en uno o más cromosomas de la célula huésped.

20 El plásmido pC4 contiene para la expresión del gen de interés el promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del Virus de Sarcoma de Rous (Cullen, *et al.*, Molec. Cell. Biol 5: 438-447 (1985)) más un fragmento aislado del potenciador del gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV) (Boshart, *et al.*, Cell 41:521-530 (1985)). Cadena abajo del promotor están los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718 que permiten la integración de los genes. Detrás de estos sitios de clonación el plásmido contiene el intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de preproinsulina de rata. También se pueden usar otros promotores de alta eficacia para la expresión, por ejemplo, del promotor de β -actina humano, los promotores temprano o tardío de SV40 o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV1. Los sistemas de expresión génica de Clontech Tet-Off y Tet-On y sistemas similares se pueden usar para expresar el TNF de una manera regulada en células de mamífero (M. Gossen y H. Bujard, Proc. Natl., Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para la poliadenilación del ARNm también se pueden usar otras señales, por ejemplo, de los genes de hormona de crecimiento humana o de globina. También se pueden seleccionar líneas celulares estables que portan un gen de interés integrado en los cromosomas tras la cotransfección con un marcador de selección tal como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso usar más de un marcador de selección al principio, por ejemplo, G418 más metotrexato.

35 El plásmido pC4 se digiere con enzimas de restricción y después se desfosforila usando fosfatasa intestinal de ternero mediante procedimientos conocidos en el técnica. Después el vector se aísla a partir de un gel de agarosa al 1%.

40 La región variable y constante aislada que codifica ADN y el vector desfosforilado se ligan después con ADN ligasa T4. Después, células HB101 o XL-1 Blue de *E. coli* se transforman y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC4 usando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

45 Para la transfección se usan células de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de un gen de DHFR activo. 5 g del plásmido de expresión pC4 se cotransfectan con 0,5 g del plásmido pSV2-neo usando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador de selección dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Las células se siembran en alfa-MEM complementado con 1 g/ml de G418. Después de 2 días, las células se tratan con tripsina y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en alfa-MEM complementado con 10, 25 o 50 ng/ml de metotrexato más 1 g/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días se tratan con tripsina clones únicos y después se siembran en placas de petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml usando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren después a placas nuevas de 6 pocillos que contienen concentraciones aún más altas de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento se repite hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100-200 mM. La expresión del producto génico deseado se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia de Western o mediante análisis de HPLC de fase inversa.

55 Ejemplo 2: Generación de Anticuerpos Monoclonales de IgG Humana de Afinidad Alta Reactivos con TNF Humano Usando Ratones Transgénicos

60 Sumario

65 Se han usado ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana para generar anticuerpos monoclonales de afinidad alta completamente humanos que se pueden usar terapéuticamente para inhibir la acción de TNF para el tratamiento de una o más enfermedades mediadas por TNF. Ratones híbridos (CBA/J x C57BL6/J)_{F2} que contienen transgenes de anticuerpos de región variable y constante humanos para cadenas tanto pesada como ligera se inmunizan con TNF recombinante humano (Taylor *et al.*, Intl.

5 Immunol. 6: 579-591 (1993); Lönberg, *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14: 826); Fishwild, *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996)). Varias fusiones produjeron uno o más paneles de anticuerpos monoclonales de IgG reactivos con TNF completamente humanos. Los anticuerpos anti-TNF completamente humanos se caracterizaron adicionalmente. Todos son IgG1. Tales anticuerpos se observa que tienen constantes de afinidad entre 1×10^9 y 9×10^{12} . Las afinidades inesperadamente altas de estos anticuerpos monoclonales completamente humanos los hacen candidatos adecuados para aplicaciones terapéuticas en enfermedades, patologías o trastornos relacionados con TNF.

10 **Abreviaturas**

- BSA - albúmina sérica bovina
- CO₂ - dióxido de carbono
- DMSO - dimetilsulfóxido
- EIA - inmunoensayo enzimático
- 15 FBS - suero fetal bovino
- H₂O₂ - peróxido de hidrógeno
- HRP - peroxidasa de rábano picante
- ID - intradérmico
- Ig - inmunoglobulina
- 20 TNF - factor de necrosis tisular alfa
- IP - intraperitoneal
- IV - intravenoso
- Mab - anticuerpo monoclonal
- DO - densidad óptica
- 25 OPD - diclorhidrato de o-fenilendiamina
- PEG - polietilenglicol
- PSA - penicilina, estreptomycin, anfotericina
- RT - temperatura ambiente
- SC - subcutáneo
- 30 v/v - volumen por volumen
- p/v - peso por volumen

Materiales y Métodos

35 **Animales**

En la técnica se conocen ratones transgénicos que pueden expresar anticuerpos humanos (y están disponibles en el mercado (por ejemplo, en GenPharm International, San Jose, CA; Abgenix, Freemont, CA y otros) que expresan inmunoglobulinas humanas pero no IgM o Ig de ratón. Por ejemplo, tales ratones transgénicos contienen transgenes de secuencia humana que experimentan unión *V(D) J*, cambio de clase de cadena pesada y mutación somática para generar un repertorio de inmunoglobulinas de secuencia humana (Lönberg, *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994)). El transgén de cadena ligera se puede obtener, por ejemplo, en parte de un clon de cromosoma artificial de levadura que incluye casi la mitad de la región V humana de línea germinal. Además, el transgén de cadena pesada puede codificar regiones constantes tanto μ humana como 1 (Fishwild, *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996)) y/o 3 humana. Se pueden usar ratones obtenidos a partir de linajes genotípicos apropiados en los procesos de inmunización y fusión para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra TNF.

50 **Inmunización**

Se puede usar uno o más programas de inmunización para generar los hibridomas anti-TNF humano. Las primeras varias fusiones se pueden realizar después del protocolo de inmunización ilustrativo siguiente, pero se pueden usar otros protocolos conocidos similares. Varios ratones macho transgénicos quirúrgicamente castrados y/o hembras de 14-20 semanas de edad se inmunizan IP y/o ID con 1-1000 μ g de TNF humano recombinante emulsionado con un volumen igual de TITERMAX o adyuvante completo de Freund en un volumen final de 100-400 μ l (por ejemplo, 200). Cada ratón también puede recibir opcionalmente 1-10 μ g en 100 μ l de solución salina fisiológica en cada uno de 2 sitios SC. Después los ratones se pueden inmunizar 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 y/o 21-34 días después IP (1-400 μ g) y SC (1-400 μ g x 2) con TNF emulsionado con un volumen igual de TITERMAX o adyuvante incompleto de Freund. Se pueden tomar muestras de sangre de los ratones 12-25 y 25-40 días después mediante punción retroorbitaria sin anticoagulante. Después, se deja que la sangre coagule a temperatura ambiente durante una hora y el suero se recoge y se titula usando un ensayo de EIA de TNF de acuerdo con métodos conocidos. Las fusiones se realizan cuando las inyecciones repetidas no provocan aumento de los títulos. En ese momento, se proporciona a los ratones una inyección de refuerzo IV final de 1-400 μ g de TNF diluido en 100 μ l de solución salina fisiológica. Tres días después, los ratones se pueden eutanasiar mediante dislocación cervical y los bazo extirparse de forma aséptica y sumergirse en 10 μ l de solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) que

contiene 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B (PSA). Los esplenocitos se recogen perfundiendo de forma estéril el bazo con PSA-PBS. Las células se lavan una vez en PSA-PBS frío, se recuentan usando exclusión de colorante Tripán azul y se resuspenden en medio RPMI 1640 que contiene Hepes 25 mM.

5

Fusión Celular

La fusión se puede realizar en una proporción de 1:1 a 1:10 de células de mieloma murinas respecto a células de bazo viables de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, como se conoce en el técnica. Como un ejemplo no limitante, las células de bazo y células de mieloma se pueden sedimentar juntas. Después, el sedimento se puede resuspender lentamente, durante 30 segundos, en 1 ml de solución de PEG/PBS al 50% (p/v) (peso molecular de PEG 1.450, Sigma) a 37°C. Después la fusión se puede detener añadiendo lentamente 10,5 ml de medio RPMI 1640 que contiene Hepes 25 mM (37°C) durante 1 minuto. Las células fusionadas se centrifugan durante 5 minutos a 500-1500 rpm. Después las células se resuspenden en medio HAT (medio RPMI 1640 que contiene Hepes 25 mM, suero Fetal de Clon I al 10% (Hyclone), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 4 mM, 10 µg/ml de gentamicina, complemento de cultivo Origen al 2,5% (Fisher), medio RPMI 1640/Hepes acondicionado con 653 al 10%, 2-mercaptoetanol 50 µM, hipoxantina 100 µM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM) y después se siembran en placas a 200 µl/pocillo en quince placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. Después las placas se colocan en una incubadora humidificada a 37°C que contiene CO₂ al 5 % y el 95% de aire durante 7-10 días.

10

15

20

Detección de Anticuerpos Anti-TNF de IgG Humana en Suero de Ratón

Se puede usar EIA en fase sólida para explorar sueros de ratón para determinar anticuerpos de IgG humanos específicos para TNF humano. En resumen, se pueden recubrir placas con TNF a 2 µg/ml en PBS durante una noche. Después de lavar en solución salina 0,15 M que contiene Tween 20 al 0,02% (v/v), los pocillos se pueden bloquear con BSA al 1% (p/v) en PBS, 200 µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se usan inmediatamente o se congelan a -20°C para uso futuro. Las diluciones de suero de ratón se incuban en las placas recubiertas con TNF a 50 µl/pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavan y después se sondan con 50 µl/pocillo de anti-IgG humana de cabra marcado con HRP, Fc específico diluido 1:30.000 en BSA-PBS al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo, las placas se pueden lavar y se añaden 100 µl/pocillo de la solución de sustrato de citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M y fosfato sódico 0,2 M, H₂O₂ al 0,01% y 1 mg/ml de OPD) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añade solución de parada (ácido sulfúrico 4 N) a 25 µl/pocillo y se leen las DO a 490 nm mediante un espectrofotómetro de placas automático.

25

30

35

Detección de Inmunoglobulinas Completamente Humanas en Sobrenadantes de Hibridoma.

Se pueden detectar hibridomas de cultivo positivo que secretan inmunoglobulinas completamente humanas usando un EIA adecuado. En resumen, se pueden recubrir placas Pop-out de 96 pocillos (VWR, 610744) con 10 µg/ml de Fc anti-IgG humana de cabra en tampón carbonato de sodio durante una noche a 4°C. Las placas se lavan y se bloquean con BSA-PBS al 1% durante una hora a 37°C y se usan inmediatamente o se congelan a -20°C. Los sobrenadantes de hibridoma no diluidos se incuban en las placas durante una hora a 37°C. Las placas se lavan y se sondan con anti-kappa humana de cabra marcada con HRP diluida en 1:10.000 en BSA-PBS al 1% durante una hora a 37°C. Después las placas se incuban con solución de sustrato como se ha descrito anteriormente.

40

45

Determinación de Reactividad de Anti-TNF Completamente Humano

Como anteriormente, se pueden ensayar simultáneamente hibridomas para determinar la reactividad contra TNF usando un RIA adecuado u otro ensayo. Por ejemplo, los sobrenadantes se incuban en Fc anti-IgG humana de cabra como anteriormente, se lavan y después se sondan con TNF marcado radiactivamente con recuentos apropiados por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan dos veces con PBS y se cuantifica el TNF marcado radiactivamente unido usando un contador adecuado.

50

55

Los hibridomas que secretan IgG1 humana anti-TNF se pueden expandir en cultivo celular y subclonarse en serie mediante dilución limitante. Las poblaciones clonales resultantes se pueden expandir y crioconservar en medio de congelación (FBS al 95% y DMSO al 5%) y almacenarse en nitrógeno líquido.

Isotipado.

La determinación de isotipo de los anticuerpos se puede conseguir usando un EIA en un formato similar al usado para explorar los sueros inmunes de ratón para títulos específicos. Se pueden recubrir placas de 96 pocillos con TNF como se ha descrito anteriormente y se puede incubar anticuerpo purificado a 2 µg/ml en la placa durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lava y se sonda con anti-IgG₁ humana de cabra marcado con HRP o anti-IgG₃ humana de cabra marcado con HRP diluidos a 1:4000 en BSA-PBS al 1% durante una hora a temperatura ambiente. De nuevo, la placa se lava y se incuba con solución de sustrato como se ha descrito anteriormente.

65

Cinética de Unión de Anticuerpos Humanos Anti-TNF Humano con TNF Humano

Las características de unión de los anticuerpos se pueden evaluar de forma adecuada usando una tecnología de EIA y Biacore de captura de TNF, por ejemplo. Concentraciones clasificadas de anticuerpos de TNF humanos purificados se pueden evaluar para determinar la unión a placas de EIA recubiertas con 2 µg/ml de TNF en ensayos como se ha descrito anteriormente. Después, las DO se pueden presentar como representaciones semilogarítmicas que muestran eficacias de unión relativas.

Se pueden obtener las constantes de unión cuantitativas, por ejemplo, de la forma siguiente o por cualquier otro método adecuado conocido. Una microplaca Biacore CM-5 (carboximetilo) se coloca en una unidad Biacore 2000. Se hace fluir tampón HBS (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% v/v, pH 7,4) sobre una celda de flujo de la microplaca a 5 µl/minuto hasta que se obtiene una medida basal estable. Una solución (100 µl) de 15 mg de EDC (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida) en 200 µl de agua se añade a 100 µl de una solución de 2,3 mg de NHS (N-hidroxisuccinimida) en 200 µl de agua. Cuarenta (40) µl de la solución resultante se inyectan en la microplaca. Seis µl de una solución de TNF humano (15 µg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4,8) se inyectan en la microplaca, dando como resultado un aumento de aproximadamente 500 RU. El tampón se cambia a tampón de procesamiento TBS/Ca/Mg/BSA (Tris 20 mM, cloruro de sodio 0,15 M cloruro de calcio 2 mM, acetato de magnesio 2 mM, Triton X-100 al 0,5%, 25 µg/ml de BSA, pH 7,4) y se hace fluir sobre la microplaca durante la noche para equilibrarla y para hidrolizar o proteger cualquier éster de succinimida que no haya reaccionado.

Los anticuerpos se disuelven en el tampón de procesamiento a 33,33, 16,67, 8,33 y 4,17 nM. El caudal se ajusta a 30 µl/min y la temperatura del instrumento a 25°C. Se usan dos celdas de flujo para los procesamientos de cinética, una en la que se había inmovilizado TNF (muestra) y una segunda celda de flujo no derivatizada (blanco). 120 µl de cada concentración de anticuerpo se inyectan sobre las celdas de flujo a 30 µl/min (fase de asociación), seguido de 360 segundos ininterrumpidos de flujo de tampón (fase de disociación). La superficie de la microplaca se regenera (se disocia el complejo factor de necrosis tisular alfa/anticuerpo) mediante dos inyecciones secuenciales de 30 µl cada una de tiocianato de guanidina 2 M.

El análisis de los datos se realiza usando BIA Evaluation 3.0 o CLAMP 2.0, como se conoce en la técnica. Para cada concentración de anticuerpo el sensograma del blanco se resta del sensograma de la muestra. Se realiza un ajuste global tanto para la constante de disociación (K_d , s⁻¹) como para la de asociación (K_a , mol⁻¹ s⁻¹) y se calcula la constante de disociación (K_D , mol) (k_d/k_a). Cuando la afinidad del anticuerpo es lo suficientemente alta para que las RU de anticuerpo capturado sean >100, se procesan diluciones adicionales del anticuerpo.

Resultados y Discusión

Generación de Anticuerpos Monoclonales anti-TNF Humano

Se realizan varias fusiones y cada fusión se siembra en 15 placas (1440 pocillos/fusión) que producen varias docenas de anticuerpos específicos para TNF humano. De éstos, se observa que algunos consisten en una combinación de cadenas de Ig humana y de ratón. Los hibridomas restantes secretan anticuerpos anti-TNF que consisten únicamente en cadenas pesada y ligera humanas. De los hibridomas humanos se espera que todos sean IgG1.

Cinética de Unión de Anticuerpos Humanos Anti-TNF Humano

El análisis de ELISA confirma que los anticuerpos purificados a partir de la mayoría o de todos estos hibridomas se unen a TNF de una manera dependiente de la concentración. Las Figuras 1-2 muestran los resultados de la eficacia de unión relativa de estos anticuerpos. En este caso, se mide la avidéz del anticuerpo por su antígeno afín (epítipo). Se ha de observar que la unión de TNF directamente a la placa de EIA puede provocar la desnaturalización de las proteínas y las afinidades de unión aparentes pueden no reflejar la unión a proteína desnaturalizada. Se observa unión del cincuenta por ciento a lo largo de un intervalo de concentraciones.

Las constantes de unión cuantitativas se obtienen usando análisis Biacore de los anticuerpos humanos y revelan que varios de los anticuerpos monoclonales humanos tienen una afinidad muy alta con K_D en el intervalo de 1×10^{-9} a 7×10^{-12} .

Conclusiones

Se realizan varias fusiones usando esplenocitos a partir de ratones híbridos que contienen transgenes de anticuerpo de región variable constante humanos que se inmunizan con TNF humano. Se genera un conjunto de varios anticuerpos monoclonales de IgG reactivos con TNF completamente humanos del isotipo IgG1. Los anticuerpos anti-TNF completamente humanos se caracterizan adicionalmente. Varios de los anticuerpos generados tienen constantes de afinidad entre 1×10^9 y 9×10^{12} . Las afinidades inesperadamente altas de estos anticuerpos

monoclonales completamente humanos los hacen adecuados para aplicaciones terapéuticas en enfermedades, patologías o afecciones relacionadas dependientes de TNF.

Ejemplo 2: Generación de Anticuerpos Monoclonales de IgG Humanos Reactivos a TNF α Humano

5

Sumario

10 Ratonos híbridos (CBA/J x C57BL/6J) F_2 (1-4) que contienen transgenes de anticuerpos de región variable y constante humana para cadenas tanto pesada como ligera se inmunizaron con TNF α humano recombinante. Una fusión, denominada GenTNV, produjo ocho anticuerpos monoclonales IgG1 κ completamente humanos que se unen a TNF α humano recombinante inmovilizado. Poco después de la identificación, las ocho líneas celulares se transfirieron a Molecular Biology para una caracterización adicional. Ya que estos mAb tienen una secuencia totalmente humana, se espera que los mismos sean menos inmunógenos que cA2 (Remicade) en seres humanos.

15 **Abreviaturas**

- BSA - albúmina sérica bovina
- CO₂ - dióxido de carbono
- DMSO - dimetilsulfóxido
- 20 EIA - inmunoensayo enzimático
- FBS - suero fetal bovino
- H₂O₂ - peróxido de hidrógeno
- HRP - peroxidasa de rábano picante
- ID - intradérmico
- 25 Ig - inmunoglobulina
- TNF - factor de necrosis tisular alfa
- IP - intraperitoneal
- IV - intravenoso
- Mab - anticuerpo monoclonal
- 30 DO - densidad óptica
- OPD - diclorhidrato de o-fenilendiamina
- PEG - polietilenglicol
- PSA - penicilina, estreptomicina, anfotericina
- RT - temperatura ambiente
- 35 SC - subcutáneo
- v/v - volumen por volumen
- p/v - peso por volumen

40 **Introducción**

Ratonos transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos se utilizaron para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos que son específicos para TNF α humano recombinante. Se espera que estos anticuerpos únicos se puedan usar, de la misma forma que cA2 (Remicade) se usa para inhibir terapéuticamente los procesos inflamatorios implicados en enfermedades mediadas por TNF α con el beneficio de semivida en suero aumentada y efectos secundarios disminuidos en relación con la inmunogenicidad.

Materiales y Métodos

50 **Animales**

Ratonos transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas, pero no IgM o Ig κ de ratón, se han desarrollado por GenPharm International. Estos ratones contienen transgenes de anticuerpos humanos funcionales que experimentan unión V(D)J, cambio de clase de cadena pesada y mutación somática para generar un repertorio de inmunoglobulinas humanas específicas de antígeno (1). Los transgenes de cadena ligera se obtienen en parte de un clon de cromosoma artificial de levadura que incluye casi la mitad del locus de V κ humano de línea germinal. Además de varios genes de VH, el transgén de cadena pesada (HC) codifica las regiones constantes tanto μ humana como γ 1 (2) y/o γ 3 humana. Un ratón obtenido del linaje genotípico HCo12/KCo5 se usó en el proceso de inmunización y fusión para generar los anticuerpos monoclonales descritos en este documento.

60 **Purificación de TNF α Humano**

Se purificó TNF α humano a partir de sobrenadante de cultivo de tejido de células C237A mediante cromatografía por afinidad usando una columna rellena con la proteína de fusión receptor TNF α -Fc (p55-sf2) (5) acoplada a Sepharose 4B (Pharmacia). El sobrenadante celular se mezcló con una novena parte de su volumen de PBS de Dulbecco 10x (D-PBS) y se pasó a través de la columna a 4°C a 4 ml/min. Después la columna se lavó con

PBS y el TNF α se eluyó con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5 y se neutralizó con Tris-HCl 2 M pH 8,5. El TNF α purificado se sometió a intercambio de tampón en Tris 10 mM, cloruro de sodio 0,12 M, pH 7,5 y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m.

5 Inmunizaciones

Un ratón GenPharm hembra, de aproximadamente 16 semanas de edad, se inmunizó IP (200 μ l) e ID (100 μ l en la base de la cola), con un total de 100 μ g de TNF α (lote JG102298 o JG102098) emulsionado con un volumen igual de adyuvante Titermax los días 0, 12 y 28. Se tomaron muestras de sangre del ratón los días 21 y 35 mediante punción retroorbitaria sin anticoagulante. Se dejó que la sangre coagulara a temperatura ambiente durante una hora y el suero se recogió y tituló usando un ensayo de EIA en fase sólida de TNF α . La fusión, denominada GenTNV, se realizó después de dejar descansar al ratón durante siete semanas después de la inyección del día 28. Al ratón, con un título de IgG humana específico de 1:160 frente a TNF α , se le proporcionó después una inyección de refuerzo IV final de 50 μ g de TNF α diluido en 100 μ l de solución salina fisiológica. Tres días después, el ratón se eutanasió por dislocación cervical y se extirpó el bazo asépticamente y se sumergió en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) que contenía 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y 0,25 μ g/ml de anfotericina B (PSA). Los esplenocitos se recogieron profundiendo de forma estéril el bazo con PSA-PBS. Las células se lavaron una vez en PSA-PBS frío, se contaron usando un contador Coulter y se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contenía Hepes 25 mM.

20

Líneas celulares

El compañero de fusión de mieloma de ratón no secretor, 653 se recibió en el grupo Cell Biology Services (CBS) el 5-14-97 a partir del grupo Centocor's Product Development. La línea celular se expandió en medio RPMI (JRH Biosciences) complementado con FBS al 10% (v/v) (Cell Culture Labs), piruvato de sodio 1 mM, NEAA 0,1 mM, L-glutamina 2 mM (todos de JRH Biosciences) y se criopreservó en FBS al 95% y DMSO al 5% (Sigma), después se almacenó en un congelador de nitrógeno líquido en fase de vapor en CBS. El banco celular era estéril (Quality Control Centocor, Malvern) y estaba libre de micoplasma (Bionique Laboratories). Las células se mantuvieron en cultivo de fase logarítmica hasta la fusión. Se lavaron en PBS, se contaron y se determinó la viabilidad (>95%) por exclusión de colorante tripán azul antes de la fusión.

30

Una línea celular recombinante, denominada C237A, generada en Molecular Biology en Centocor produjo TNF α humano. La línea celular se expandió en medio IMDM (JRH Biosciences) complementado con FBS al 5% (v/v) (Cell Culture Labs), L-glutamina 2 mM (todos de JRH Biosciences) y 0,5 μ g/ml de ácido micofenólico y se criopreservó en FBS al 95% y DMSO al 5% (Sigma), después se almacenó en un congelador de nitrógeno líquido en fase de vapor en CBS (13). El banco celular era estéril (Quality Control Centocor, Malvern) y estaba libre de micoplasma (Bionique Laboratories).

35

Fusión Celular

La fusión celular se realizó usando una proporción 1:1 de células de mieloma murinas 653 y células de bazo murinas viables. En resumen, las células de bazo y las células de mieloma se sedimentaron juntas. El sedimento se resuspendió lentamente a lo largo de un periodo de 30 segundos en 1 ml de solución de PEG/PBS al 50% (p/v) (peso molecular de PEG de 1.450 g/mol, Sigma) a 37°C. La fusión se detuvo añadiendo lentamente 10,5 ml de medio RPMI (sin aditivos) (JRH) (37°C) durante 1 minuto. Las células fusionadas se centrifugaron durante 5 minutos a 750 rpm. Después, las células se resuspendieron en medio HAT (medio RPMI/HEPES que contenía suero fetal bovino al 10% (JRH), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, 10 μ g/ml de gentamicina, complemento de cultivo Origen al 2,5% (Fisher), 2-mercaptoetanol 50 μ M, medio RPMI acondicionado con 653 al 1%, hipoxantina 100 μ M, aminopterina 0,4 μ M y timidina 16 μ M) y después se sembraron a 200 μ l/pocillo en cinco placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. Después las placas se colocaron en una incubadora a 37°C humidificada que contenía CO₂ al 5% y el 95% de aire durante 7-10 días.

45

50

Detección de Anticuerpos Anti-TNF α de IgG Humana en Suero de Ratón

Se usaron ELA en fase sólida para explorar sueros de ratón para anticuerpos de IgG humanos específicos para TNF α humano. En resumen, las placas se recubrieron con TNF α a 1 μ g/ml en PBS durante una noche. Después de lavar en solución salina 0,15 M que contenía Tween 20 al 0,02% (v/v), los pocillos se bloquearon con BSA al 1% (p/v) en PBS, 200 μ l/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se usaron inmediatamente o se congelaron a -20°C para un uso futuro. Los sueros de ratón se incubaron en diluciones seriadas dobles en las placas recubiertas con TNF α humano a 50 μ l/pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron y después se sondaron con 50 μ l/pocillo de anti-IgG humana de cabra marcado con HRP, Fc específico (Accurate) diluido 1:30.000 en BSA-PBS al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo, las placas se lavaron y se añadieron 50 μ l/pocillo de la solución de sustrato de citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio 0,2 M, H₂O₂ al 0,01% y 1 mg/ml de OPD) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se

60

añadió solución de parada (ácido sulfúrico 4 N) a 25 µl/pocillo y se leyeron las DO a 490 nm usando un espectrofotómetro de placas automático.

Detección de Inmunoglobulinas Completamente Humanas en Sobrenadantes de Hibridoma

Debido a que el ratón de GenPharm es capaz de generar cadenas de inmunoglobulina tanto de ratón como humanas, se usaron dos ensayos de EIA separados para ensayar los clones de hibridoma de cultivo positivo para determinar la presencia de tanto cadenas ligeras humanas como cadenas pesadas humanas. Las placas se recubrieron como se ha descrito anteriormente y los sobrenadantes de hibridomas no diluidos se incubaron en las placas durante una hora a 37°C. Las placas se lavaron y se sondaron con anticuerpo anti-kappa humana de cabra conjugado con HRP (Southern Biotech) diluido 1:10.000 en BSA-HBSS al 1% o anticuerpo específico de Fc anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP diluido a 1:30.000 en BSA-HBSS al 1% durante una hora a 37°C. Después las placas se incubaron con solución de sustrato como se ha descrito anteriormente. Se descartaron los clones de hibridoma que no daban una señal positiva en los formatos de EIA tanto de anti-kappa como Fc anti-IgG humana.

Isotipado

La determinación de isotipo de los anticuerpos se consiguió usando un EIA en un formato similar al usado para explorar los sueros inmunes de ratón para títulos específicos. Las placas de EIA se recubrieron con anti-IgG humana de cabra (H+L) en tampón de carbonato de sodio durante una noche a 4°C y se bloquearon como se ha descrito anteriormente. Los sobrenadantes puros de cultivos de 24 pocillos se incubaron en la placa durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó y se sondó con IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ ant-humana de cabra marcado con HRP (Binding Site) diluido a 1:4000 en BSA-PBS al 1% durante una hora a temperatura ambiente. De nuevo, la placa se lavó y se incubó con solución de sustrato como se ha descrito anteriormente.

Resultados y Discusión.

Generación de Anticuerpos Monoclonales Anti-TNFα Humano Completamente Humanos

Una fusión, denominada GenTNV, se realizó a partir de un ratón de GenPharm inmunizado con proteína TNF-α humana recombinante. A partir de esta fusión, se seleccionaron 196 híbridos de cultivo positivo. Se identificaron ocho líneas de células de hibridoma que secretaban anticuerpos de IgG completamente humanos reactivos con TNFα humano. Estas ocho líneas celulares secretaban cada una inmunoglobulinas del isotipo IgG1κ humano y todas se subclonaron dos veces mediante dilución limitante para obtener líneas celulares estables (>90% homogéneas). Los nombres de la línea celular y las denominaciones de código C respectivas se enumeran en la Tabla 1. Cada una de las líneas celulares se congeló en bancos celulares de investigación de 12 viales almacenadas en nitrógeno líquido.

Las células parentales recogidas de los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos para cada una de las ocho líneas celulares se pasaron al grupo Molecular Biology el 18-02-99 para una transfección y caracterización adicional.

Tabla 1: Denominaciones de Línea Celular de GenTNV

Nombre	Denominación de Código C
GenTNV14.17.12	C414A
GenTNV15.28.11	C415A
GenTNV32.2.16	C416A
GenTNV86.14.34	C417A
GenTNV118.3.36	C418A
GenTNV122.23.2	C419A
GenTNV148.26.12	C420A
GenTNV196.9.1	C421A

Conclusión

La fusión de GenTNV se realizó utilizando esplenocitos de un ratón híbrido que contenía transgenes de anticuerpo de región variable y constante humanos que se inmunizó con TNFα humano recombinante preparado en Centocor. Se generaron ocho anticuerpos monoclonales de IgG reactivos contra TNFα completamente humanos del isotipo IgG1κ. Las líneas celulares parentales se transfirieron al grupo Molecular Biology para caracterización y desarrollo adicional. Uno de estos nuevos anticuerpos humanos puede ser útil como antiinflamatorio con el beneficio potencial de una inmunogenicidad y complicaciones de tipo alérgico disminuidas en comparación con Remicade.

Bibliografía

1. Taylor, et al., *International Immunology* 6: 579-591 (1993).
2. Lonberg, et al., *Nature* 368: 856-859 (1994).
3. Neuberger, M. *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996).
4. Fishwild, et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996).
5. Scallan, et al., *Cytokine* 7: 759-770 (1995).

Ejemplo 3: Clonación y Preparación de Líneas Celulares que Expresan Anticuerpos anti-TNF α Humano

Sumario

Se observó que un panel de ocho anticuerpos monoclonales humanos (mAb) con una denominación TNV se unían a TNF α humano inmovilizado con una avidéz aparentemente alta. Siete de los ocho mAb demostraron ser eficaces para bloquear la unión de huTNF α a un receptor de TNF recombinante. El análisis de secuencia del ADN que codifica los siete mAb confirmó que todos los mAb tenían regiones V humanas. Las secuencias de ADN también mostraron que tres pares de los mAb eran idénticos entre sí, de forma que el panel original de ocho mAb contenía sólo cuatro mAb diferentes, representados por TNV14, TNV15, TNV148 y TNV196. Basándose en los análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de los mAb y los resultados de los datos de neutralización de TNF α *in vitro*, se seleccionaron los mAb TNV148 y TNV14 para un estudio adicional.

Debido a que el resto de prolina en la posición 75 (región flanqueante 3) en la cadena pesada de TNV148 no se encontró en esa posición en otros anticuerpos humanos del mismo subgrupo durante una búsqueda en una base de datos, se realizó mutagénesis de ADN dirigida para codificar un resto de serina en esa posición para que concordara con secuencias de región flanqueante de línea germinal conocidas. Los mAb modificados con serina se denominaron TNV148B. El ADN amplificado por PCR que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera de TNV148B y TNV14 se clonó en vectores de expresión recién preparados que se basaban en los genes de cadena pesada y ligera clonados recientemente de otro mAb humano (12B75), descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos presentada el 7 de octubre de 2000, titulada Anticuerpos IL-12, Composiciones, Métodos y Usos.

Células P3X63Ag8.653 (653) o células de mieloma de ratón Sp2/0-Ag14 (SP2/0) se transfectaron con los plásmidos de expresión de cadena pesada y ligera respectivos y se seleccionaron a través de dos rondas de subclonación para líneas celulares que producen niveles altos de mAb TNV148B y TNV14 recombinantes (rTNV148B y rTNV14) mAbs. Las evaluaciones de curvas de crecimiento y la estabilidad de la producción de mAb a lo largo del tiempo indicaba que los clones transfectantes de 653 C466D y C466C producían de forma estable aproximadamente 125 μ g/ml de mAb rTNV148B en cultivos agotados mientras que el transfectante de SP2/0 1.73-12-122 (C467A) produjo de forma estable aproximadamente 25 μ g/ml de mAb rTNV148B en cultivos agotados. Análisis similares indicaron que el clon transfectante de Sp2/0 C476A produjo 18 μ g/ml de rTNV14 en cultivos agotados.

Introducción

Un panel de ocho mAb obtenidos a partir de ratones GenPhanm/Medarex inmunizados con TNF α humano (genotipo HCo12/KCo5) demostraron previamente que se unían a TNF α humano y que tenían un isotipo kappa de IgG1 completamente humano. Se usó un ensayo de unión sencilla para determinar si era probable que los mAb ilustrativos de la invención tuvieran actividad neutralizante de TNF α evaluando su habilidad para bloquear la unión de TNF α a receptor de TNF recombinante. Basándose en esos resultados, los resultados de secuencia de ADN y caracterizaciones *in vitro* de varios de los mAb, se seleccionó TNV148 como el mAb que se caracterizaría adicionalmente.

Las secuencias de ADN que codifican el mAb TNV148 se clonaron, se modificaron para ajustarse en vectores de expresión génica que codifican regiones constantes adecuadas, se introdujeron en las células de mieloma de ratón bien caracterizadas 653 y SP2/0 y las líneas celulares transfectadas resultantes se exploraron hasta que se identificaron subclones que producían 40 veces más mAb que la línea celular de hibridoma original.

Materiales y Métodos

Reactivos y células

El reactivo TRIZOL se adquirió en Gibco BRL. Se obtuvo proteinasa K en Sigma Chemical Company. Se obtuvo transcriptasa inversa en Life Sciences, Inc. Se obtuvo ADN Polimerasa Taq en Perkin Elmer Cetus o Gibco BRL. Las enzimas de restricción se adquirieron en New England Biolabs. El Kit de purificación de PCR QIAquick era de Qiagen. Un kit de mutagénesis dirigida QuikChange se adquirió en Stratagene. Los kits Wizard plasmid miniprep y RNasin eran de Promega. Se obtuvieron Optiplates en Packard. El ¹²⁵yodo se adquirió en Amersham. Los oligonucleótidos personalizados se adquirieron en Keystome/Biosource Internacional. Los nombres, números de identificación y secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para clonar, modificar por ingeniería genética o secuenciar los genes de mAb TNV. Los aminoácidos codificados por los oligonucleótidos 5'14s y HuH-J6 se muestran encima de la secuencia. El resto aminoacídico "M" representa el codón de inicio de la traducción. Las secuencias subrayadas en los oligonucleótidos 5'14s y HuH-J6 marcan los sitios de restricción BsiWI y BstBI, respectivamente. La barra en HuH-J6 corresponde al límite de exón/intrón. Obsérvese que los oligonucleótidos cuya secuencia corresponden a la hebra negativa se escriben en una orientación 3'-5'.

Nombre	I.D.	Secuencia
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5'
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5'
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5'
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5'
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5'
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5'
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5'
		BsiWI M D W T W S I
5'14s	366	5'-TTTC <u>GTACGCC</u> ACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3'
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3'
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3'
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3'
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3'
		T V T V S S BstBI
HuH-J6	388	3'-GTGCCAGTGGCAGAGGAGTC/CATTCA <u>AGCTTA</u> AGTT-5'
		SalI M D M R V
LK7s	362	5'-TTT <u>GTCGAC</u> ACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3'
LVgs	363	5'-TTTGTGCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3'
		T K V D I K AflII
HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCA <u>GAAATTC</u> GGCGCCTTT
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATC-3'
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCCTTGTGCGACATAG-5'

Se obtuvo un solo vial congelado de células de mieloma de ratón 653. El vial se descongeló ese día y se expandió en matraces T en IMDM, FBS al 5%, glutamina 2 mM (medios). Estas células se mantuvieron en cultivo continuo hasta que se transfectaron 2 a 3 semanas más tarde con el ADN anti-TNF descrito en este documento. Algunos de los cultivos se recogieron 5 días después de la fecha de descongelación, se sedimentaron mediante centrifugación y se resuspendieron en FBS al 95%, DMSO al 5%, se dividieron en alícuotas en 30 viales, se

congelaron y se almacenaron para un uso futuro. De forma similar, se obtuvo un solo vial congelado de células de mieloma de ratón SP2/0. El vial de descongeló, se preparó una nueva congelación como se ha descrito anteriormente y los viales congelados se almacenaron en las cajas de congelador CBC AA y AB. Estas células se descongelaron y se usaron para todas las transfecciones de SP2/0 descritas en este documento.

5

Ensayo para Inhibición de Unión de TNF a Receptor

Se usaron sobrenadantes de células de hibridoma que contenían los mAb de TNV para ensayar la capacidad de los mAb de bloquear la unión de TNF α marcado con 125 I a la proteína de fusión de receptor de TNF recombinante, p55-sf2 (Scallon et al. (1995) Cytokine 7: 759-770). Se añadieron 50 μ l de p55-sf2 a 0,5 μ g/ml en PBS a Optiplates para recubrir los pocillos durante una incubación de una hora a 37°C. Se prepararon diluciones seriadas de los ocho sobrenadantes de células TNV en placas de fondo redondo de 96 pocillos usando PBS/BSA al 0,1% como diluyente. El sobrenadante celular que contenía mAb anti-IL18 se incluyó como un control negativo y el mismo sobrenadante anti-IL18 con adiciones de cA2 (anticuerpo quimérico anti-TNF, Remicade, patente de Estados Unidos N° 5.770.198) se incluyó como un control positivo. Se añadió TNF α marcado con 125 I (58 μ Ci/ μ g, D. Shealy) a 100 μ l de sobrenadantes celulares para tener una concentración de TNF α final de 5 ng/ml. La mezcla se preincubó durante una hora a TA. Las Optiplates recubiertas se lavaron para retirar p55-sf1 no unido y 50 μ l de la mezcla de TNF α - 125 I/sobrenadante celular se transfirió a las Optiplates. Después de 2 h a TA, las Optiplates se lavaron tres veces con PBS-Tween. Se añadieron 100 μ l de Microscint-20 y se determinó la cpm unida usando el contador gamma TopCount.

20

Amplificación de Genes V y Análisis de Secuencia de ADN

Las células de hibridoma se lavaron una vez en PBS antes de la adición de reactivo TRIZOL para preparación de ARN. Entre 7×10^6 y $1,7 \times 10^7$ células se resuspendieron en 1 ml de TRIZOL. Los tubos se agitaron vigorosamente después de la adición de 200 μ l de cloroformo. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo y se añadió un volumen igual de isopropanol. Los tubos se agitaron vigorosamente y se dejó que se incubaran a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos. Los sedimentos se lavaron una vez con 1 ml de etanol al 70% y se secaron de forma breve en un secador de vacío. Los sedimentos de ARN se resuspendieron con 40 μ l de agua tratada con DEPC. La calidad de las preparaciones de ARN se determinó fraccionando 0,5 μ l en un gel de agarosa al 1%. El ARN se almacenó en un congelador a -80°C hasta su uso.

25

30

Para preparar ADNc de cadena pesada y ligera, se prepararon mezclas que incluían 3 μ l de ARN y 1 μ g de oligonucleótido 119 (cadena pesada) u oligonucleótido 117 (cadena ligera) (véase la Tabla 1) en un volumen de 11,5 μ l. La mezcla se incubó a 70°C durante 10 minutos en un baño de agua y después se enfrió en hielo durante 10 minutos. Se preparó una mezcla separada que estaba formada por 2,5 μ l de tampón de transcriptasa inversa 10X, 10 μ l de dNTP 2,5 mM 1 μ l de transcriptasa inversa (20 unidades) y 0,4 μ l de inhibidor de ribonucleasa RNasin (1 unidad). 13,5 μ l de esta mezcla se añadieron a los 11,5 μ l de la mezcla del ARN enfriado/oligonucleótido y la reacción se incubó durante 40 minutos a 42°C. La reacción de síntesis de ADNc después se almacenó en un congelador a -20°C hasta su uso.

35

40

Los ADNc de cadena pesada y ligera no purificados se usaron como moldes para amplificar por PCR las secuencias codificantes de región variable. Cinco pares de oligonucleótidos (366/354, 367/354, 368/354, 369/354 y 370/354, Tabla 1) se ensayaron simultáneamente para determinar su capacidad de amplificación por cebador del ADN de cadena pesada. Dos pares de oligonucleótidos (362/208 y 363/208) se ensayaron simultáneamente para determinar su capacidad de amplificación por cebador del ADN de cadena ligera. Las reacciones de PCR se realizaron usando 2 unidades de ADN polimerasa Taq de alta fidelidad (HIFI) PLATMUM™ en un volumen total de 50 μ l. Cada reacción incluía 2 μ l de una reacción de ADNc, 10 pmoles de cada oligonucleótido, dNTP 0,2 mM, 5 μ l de tampón HIFI 10 X y sulfato de magnesio 2 mM. El programa de termociclador fue 95°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de (94°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos, 68°C durante 1,5 minutos). Después hubo una incubación final a 68°C durante 10 minutos.

45

50

Para preparar los productos de PCR para secuenciación de ADN directa, los mismos se purificaron usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN se eluyó de la columna spin usando 50 μ l de agua estéril y después se secó hasta un volumen de 10 μ l usando un secador de vacío. Las reacciones de secuenciación de ADN se ajustaron después con 1 μ l de producto de PCR purificado, cebador oligonucleotídico 10 μ M, 4 μ l de mezcla de reacción preparada BigDye Terminator™ y 14 μ l de agua estéril para un volumen total de 20 μ l. Los productos de PCR de cadena pesada preparados con el par de oligonucleótidos 367/354 se secuenciaron con cebadores de oligonucleótidos 159 y 360. Los productos de PCR de cadena ligera preparados con el par de oligonucleótidos 363/208 se secuenciaron con los oligonucleótidos 34 y 163. El programa de termociclador para secuenciación fue 25 ciclos de (96°C durante 30 segundos, 50°C durante 15 segundos, 60°C durante 4 minutos) seguido de 4°C durante una noche. Los productos de reacción se fraccionaron a través de un gel de poliacrilamida y se detectaron usando un secuenciador de ADN ABI 377.

55

60

Mutagénesis Dirigida Para Cambiar un Aminoácido

5 Se cambió un único nucleótido en la secuencia de ADN de región variable de cadena pesada de TNV148 para reemplazar Pro⁷⁵ con un resto de Serina en el mAb de TNV148. Se diseñaron oligonucleótidos complementarios, 399 y 400 (Tabla 1) y ordenaron para realizar este cambio usando el sitio de clonación BsiWI único justo cadena arriba del sitio de inicio de la traducción, siguiendo el protocolo del fabricante. El plásmido resultante se denominó p1747. Para introducir un sitio BstBI en el extremo 3' de la región variable, se diseñó un cebador oligonucleotídico 5' con sitios Sall y BstBI. Este cebador se usó con el cebador inverso pUC para amplificar un fragmento de 2,75 kb de p1747. Después, este fragmento se volvió a clonar en el sitio Sall de origen natural en la región variable de 12B75 y un sitio HindIII, introduciendo de este modo el sitio BstBI único. El vector intermediario resultante, denominado p1750, podría aceptar fragmentos de región variable con extremos BsiWI y BstBI. Para preparar una versión de vector de cadena pesada en la que la región constante también procediera del gen 12B75, el inserto BamHI- HindIII en p1750 se transfirió a pBR322 para tener un sitio EcoRI cadena abajo del sitio HindIII. El plásmido resultante, p1768, después se digirió con HindIII y EcoRI y se ligó en un fragmento de 5,7 kb HindIII-EcoRI de p1744, un subclón obtenido clonando el fragmento grande de BamHI-BamHI de p1560 en pBC. El plásmido resultante, p1784, después se usó como vector para los fragmentos de ADNc de Ab de TNV con extremos BsiWI y BstBI. Se realizó trabajo adicional para preparar vectores de expresión, p1788 y p1798, que incluyen la región constante de IgG1 del gen 12B75 y difieren entre sí en cuánto del intrón J-C de cadena pesada de 12B75 contienen los mismos.

25 Para modificar el gen de cadena ligera 12B75 en el plásmido p1558, un fragmento de 5,7 kb Sall/AflII que contiene la región de promotor y variable de 12B75 se transfirió de p1558 a los sitios XhoI/AflII del plásmido L28. Este nuevo plásmido, p1745, proporcionó un molde más pequeño para la etapa de mutagénesis. Se usaron oligonucleótidos (C340sall y C340sal2) para introducir un sitio de restricción único Sall en el extremo 5' de la región variable mediante mutagénesis QuikChange™. El vector intermediario resultante, p1746, tenía sitios de restricción únicos Sall y AflII en los que se podrían clonar fragmentos de región variable. Cualquier fragmento de región variable clonado en p1746 se uniría preferiblemente con la mitad 3' del gen de cadena ligera. Para preparar un fragmento de restricción desde la mitad 3' del gen de cadena ligera 12B75 que se podría usar con este propósito, los oligonucleótidos BAHN1 y BAHN-2 se hibridaron entre sí para formar un enlazador bicatenario que contenía los sitios de restricción BsiW1, AflII, HindII y NotI y que contenía extremos que se podrían ligar en sitios KpnI y SacI. Este enlazador se clonó entre los sitios KpnI y SacI de pBC para producir el plásmido p1757. Un fragmento de 7,1 kb que contiene la región constante de cadena ligera de 12B75 generado digiriendo p1558 con AflII, y después digiriendo parcialmente con HindIII, se clonó entre los sitios AflII y HindII de p1757 para producir p1762. Este nuevo plásmido contenía sitios únicos para BsiWI y AflII en los que el fragmento BsiWI/AflII que contenía las regiones de promotor y variables se podía transferir uniendo las dos mitades del gen.

Clonación y Ensamblaje de ADNc de Plásmidos de Expresión

40 Todas las reacciones de RT-PCR (véase anteriormente) se trataron con enzima Klenow para llenar adicionalmente los extremos de ADN. Los fragmentos de PCR de cadena pesada se digirieron con enzimas de restricción BsiWI y BstBI y después se clonaron entre los sitios BsiWI y BstBI del plásmido L28 (se usó L28 debido a que el vector intermedio basado en 12B75 p1750 no se había preparado todavía). El análisis de secuencia de ADN de los insertos clonados mostró que las construcciones resultantes eran correctas y que no se habían introducido errores durante las amplificaciones por PCR. Los números de identificación asignados para estas construcciones de plásmido L28 (para TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B y TNV196) se muestran en la Tabla 2.

50 Los insertos de BsiWI/BstBI para las cadenas pesadas de TNV14, TNV148 y TNV148B se transfirieron desde el vector L28 hasta el vector intermediario recién preparado, p1750. Los números de identificación asignados para estos plásmidos intermediarios se muestran en la Tabla 2. Esta etapa de clonación y las etapas posteriores no se realizaron para TNV 15 y TNV 196. Después, las regiones variables se transfirieron en dos vectores de expresión de IgG1 humana diferentes. Las enzimas de restricción EcoRI y HindIII se usaron para transferir las regiones variables en el vector de IgG1 usado previamente de Centocor, p104. Los plásmidos de expresión resultantes, que codifican una IgG1 del alotipo Gm(f+), se denominaron p1781 (TNV14), p1782 (TNFV148) y p1783 (TNV148B) (véase la Tabla 2). Las regiones variables también se clonaron cadena arriba de la región constante de IgG1 obtenida del gen 12B75 (GenPharm). Esos plásmidos de expresión, que codifican una IgG1 del alotipo Gm(z), también se enumeran en la Tabla 2.

60

65

Tabla 2. Números de identificación de plásmido para diversos plásmidos de cadena pesada y ligera. El vector L28 o vector pBC representa el clon de ADNc de Ab inicial. Los insertos en esos plásmidos se transfirieron a un vector basado en 12B75 incompleto para preparar los plásmidos intermedios. Una etapa de transferencia adicional dio como resultado los plásmidos de expresión finales, que se introdujeron en células después de linealizarse o se usaron para purificar los insertos de gen de mAb antes de la transfección celular. (NR) = no realizado.

mAb	ID de Plásmido vector L28	ID de Plásmido Intermedio	ID de Plásmido de Expresión Gm(+)	ID de Plásmido de expresión GIm(z)
<i>Cadenas Pesadas</i>				
TNFV14	p1751	p1777	p1781	P1786
TNV15	p1752	(ND)	(ND)	(ND)
TNV148	p1753	p1778	p1782	p1787
TNV148B	p1760	p1779	p1783	p1788
TNV196	p1754	(ND)	(ND)	(ND)
		ID de Plásmido vector pBC	ID de Plásmido Intermedio	ID de Plásmido de expresión
<i>Cadenas Ligeras</i>				
TNV14		p1748	p1755	p1775
TNV15		p1748	p1755	p1775
TNV148		p1749	p1756	p1776
TNV196		p1749	p1756	p1776

Los productos de PCR de cadena ligera se digirieron con enzimas de restricción Sall y SacII y después se clonaron entre los sitios Sall y SacII del plásmido pBC. Las dos diferentes versiones de cadena ligera, que diferían en un aminoácido, se denominaron p1748 y p1749 (Tabla 2). El análisis de secuencia de ADN confirmó que estas construcciones tenían las secuencias correctas. Los fragmentos Sall/Afill en p1748 y p1749 después se clonaron entre los sitios Sall y Afill del vector intermediario p1746 para preparar p1755 y p1756, respectivamente. Estas mitades 5' de los genes de cadena ligera después se unieron a las mitades 3' del gen transfiriendo los fragmentos BsiWI/Afill de p1755 y p1756 a la construcción recién preparada p1762 para preparar los plásmidos de expresión finales p1775 y p1776, respectivamente (Tabla 2).

Transfecciones, Exploración y Subclonación de Células

Se realizaron un total de 15 transfecciones de células de mieloma de ratón con los diversos plásmidos de expresión de TNV (véase la Tabla 3 en la sección de Resultados y Discusión). Estas transfecciones se distinguían en que (1) las células huésped eran SP2/0 ó 653; (2) la región constante de cadena pesada estaba codificada por el vector de IgG1 previo de Centocor o la región constante de cadena pesada de 12B75; (3) el mAb era TNV148B, TNV 148, TNV14 o una nueva combinación de HC/LC; (4) si el ADN era un plásmido linealizado o inserto de gen AB purificado y (5) la presencia o ausencia de la secuencia intrónica J-C completa en el gen de cadena pesada. Además, se repitieron varias de las transfecciones para aumentar la probabilidad de que se pudiera explorar un gran número de clones.

Cada una de las células SP2/0 y células 653 se transfectaron con una mezcla de ADN de cadena pesada y ligera (8-12 µg cada uno) mediante electroporación usando condiciones convencionales como se ha descrito previamente (Knight, DM et al. (1993) Molecular Immunology 30: 1443-1453). Para los números de transfección 1, 2, 3 y 16, los plásmidos de expresión apropiados se linealizaron mediante digestión con una enzima de restricción antes de la transfección. Por ejemplo, se usaron enzimas de restricción Sall y NotI para linealizar el plásmido de cadena pesada de TNV148B p1783 y el plásmido de cadena ligera p1776, respectivamente. Para las transfecciones restantes, se separaron insertos de ADN que contenían sólo el gen de mAb del vector plasmídico digiriendo los plásmidos de cadena pesada con BamHI y plásmidos de cadena ligera, con BsiWI y NotI. Los insertos de genes de mAb después se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y resinas de purificación Qiex. Las células transfectadas con insertos de genes purificados se transfectaron simultáneamente con 3-5 µg de plásmido pSV2gpt linealizado con PstI (p13) como una fuente de marcador de selección. Después de la electroporación, las células se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en IMDM, FBS al 15%, glutamina 2 mM y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5%. Dos días más tarde, se añadió un volumen igual de IMDM, FBS al 5%, glutamina 2 mM, selección de MHX 2X (MHX 1 X = 0,5 µg/ml de ácido micofenólico, 2,5 µg/ml de hipoxantina, 50 µg/ml de xantina) y las placas se incubaron durante 2 a 3 semanas adicionales mientras se formaban colonias.

Los sobrenadantes celulares recogidos de pocillos con colonias se ensayaron para determinar IgG humana mediante ELISA como se ha descrito. En resumen, diversas diluciones de los sobrenadantes celulares se incubaron en placas de EIA de 96 pocillos con fragmento Fc anti-IgG humana de cabra policlonal y después se detectó la IgG humana unida usando anti-IgG humana (H + L) de cabra conjugado con Fosfatasa Alcalina y los sustratos de color apropiados. Las curvas patrón, que usaron como patrón el mismo mAb purificado que se estaba midiendo en los sobrenadantes celulares, se incluyeron en cada placa EIA para posibilitar la cuantificación de la IgG humana en los sobrenadantes. Las células en esas colonias que parecía que producían la mayoría de IgG humana se pasaron a

placas de 24 pocillos para determinaciones de producción adicionales en cultivos agotados y posteriormente se identificaron los clones parentales de mayor producción.

5 Los clones parentales de mayor producción se subclonaron para identificar subclones de producción más alta y para preparar una línea celular más homogénea. Placas de cultivo de tejido de 96 pocillos se sembraron con una célula por pocillo o cuatro células por pocillo en IMDM, FBS al 5%, glutamina 2 mM, 1 X MHX y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% durante 12 a 20 días hasta que fueron evidentes las colonias. Los sobrenadantes celulares se recogieron de los pocillos que contenían una colonia por pocillo y se analizaron mediante ELISA como se ha descrito anteriormente. Las colonias seleccionadas se pasaron a placas de 24 pocillos y se dejó que los cultivos se agotaran antes de identificar los subclones de mayor producción mediante la cuantificación de los niveles de IgG humana en sus sobrenadantes. Este proceso se repitió cuando subclones seleccionados de primer ciclo se sometieron a un segundo ciclo de subclonación. Los mejores clones de segundo ciclo se seleccionaron como las líneas celulares para desarrollo.

15 **Caracterización de Subclones Celulares**

Se eligieron los mejores subclones de segundo ciclo y se realizaron curvas de crecimiento para evaluar la producción de los niveles de mAb y las características de crecimiento celular. Se sembraron matraces T75 con 1×10^5 células/ml en 30 ml de IMDM, FBS al 5%, glutamina 2 mM y MHX 1X (o medio sin suero). Se tomaron alícuotas de 300 µl en intervalos de 24 h y se determinó la densidad de células vivas. Los análisis continuaron hasta que el número de células vivas fue menor que 1×10^5 células/ml. Se ensayaron las alícuotas recogidas de sobrenadantes celulares para determinar la concentración de anticuerpo presente. Se realizaron ensayos de ELISA usando un patrón de rTNV148B o rTNV14 JG92399. Las muestras se incubaron durante 1 hora en placas de ELISA recubiertas con Fc policlonal de cabra anti-IgG humana y el mAb unido se detectó con anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H + L) conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:1000.

También se realizó un análisis de curvas de crecimiento diferente para dos líneas celulares con el propósito de comparar los índices de crecimiento en presencia de cantidades variables de selección con MHX. Las líneas celulares C466A y C466B se descongelaron en medios sin MHX (IMDM, FBS al 5% y glutamina 2 mM) y se cultivaron durante dos días más. Los dos cultivos celulares después se dividieron en tres cultivos que no contenían MHX o contenían MHX 0,2X o MHX 1X (MHX 1X = 0,5 µg/ml de ácido micofenólico, 2,5 µg/ml de hipoxantina y 50 µg/ml de xantina). Un día después, se sembraron matraces T75 nuevos con los cultivos a una densidad inicial de 1×10^5 células/ml y se recontaron las células en intervalos de 24 horas durante una semana. No se recogieron las alícuotas para la producción de mAb. Se calcularon tiempos de duplicación para estas muestras usando la fórmula proporcionada en SOP PD32.025.

Se realizaron estudios adicionales para evaluar la estabilidad de la producción de mAb a lo largo del tiempo. Los cultivos se desarrollaron en placas de 24 pocillos en IMDM, FBS al 5%, glutamina 2 mM, con o sin selección con MHX. Los cultivos se separaron en cultivos nuevos en el momento en que se volvían confluentes y después se dejaba que se agotara el cultivo más antiguo. En este momento, se tomó una alícuota de sobrenadante y se almacenó a 4°C. Se tomaron alícuotas a lo largo de un período de 55-78 días. Al final de este período los sobrenadantes se ensayaron para determinar la cantidad de anticuerpo presente mediante el ELISA de Fc anti-IgG humana como se ha descrito anteriormente.

45 **Resultados y Análisis**

Inhibición de Unión de TNF a Receptor Recombinante

Se realizó un ensayo de unión sencillo para determinar si los ocho mAb de TNV que estaban contenidos en el sobrenadante de células de hibridoma eran capaces de bloquear la unión de TNF α al receptor. Las concentraciones de los mAb de TNV en sus sobrenadantes celulares respectivos se determinaron en primer lugar mediante análisis ELISA convencional para IgG humana. Después, una proteína de fusión recombinante de receptor de TNF/IgG p55, p55-Sf2, se aplicó como un recubrimiento sobre placas de EIA y se dejó que TNF α marcado con ¹²⁵I se uniera al receptor p55 en presencia de cantidades variables de mAb de TNV. Como se muestra en la Figura 1, todos menos uno (TNV122) de los ocho mAb de TNV bloquearon eficazmente la unión de TNF α al receptor p55. De hecho, los mAb de TNV parecían ser más eficaces para inhibir la unión de TNF α que el mAb de control positivo de cA2 que se había añadido en cantidades conocidas al sobrenadante de hibridoma de control negativo. Se interpretó que estos indicaban que era altamente probable que los mAb de TNV bloquearan la bioactividad de TNF α en ensayos basados en células e *in vivo* y, por lo tanto, se garantizaron análisis adicionales.

Análisis de la Secuencia de ADN

Confirmación de que los ARN Codifican mAb Humanos

65 Como una primera etapa en la caracterización de los siete mAb de TNV (TNV14, TNV15, TNV32, TNV86,

TNV118, TNV148 y TNV196) que mostraron actividad bloqueante de TNF α en el ensayo de unión a receptor, se aisló el ARN total a partir de las siete líneas celulares de hibridoma que producen estos mAb. Después, cada muestra de ARN se usó para preparar ADNc de cadena pesada o ligera de anticuerpo humano que incluía la secuencia señal completa, la secuencia de región variable completa y parte de la secuencia de región constante para cada mAb. Estos productos de ADNc después se amplificaron en reacciones de PCR y el ADN amplificado por PCR se secuenció directamente sin clonar antes los fragmentos. Los ADNc de cadena pesada secuenciados eran idénticos en más del 90% a uno de los cinco genes de línea germinal humanos presentes en los ratones, DP-46 (Figura 2). De forma similar, los ADNc de cadena ligera secuenciados tenían una identidad del 100% o del 98% con uno de los genes de línea germinal humanos presentes en los ratones (Figura 3). Estos resultados de secuencia confirmaron que las moléculas de ARN que se transcribieron en ADNc y se secuenciaron codificaban cadenas pesadas de anticuerpo humano y cadenas ligeras de anticuerpo humano. Se ha de observar que, debido a que las regiones variables se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos que se localizan en el extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia señal, los primeros aminoácidos de la secuencia señal pueden no ser la secuencia real de los productos de traducción de TNV originales, pero representan las secuencias reales de los mAb de TNV recombinantes.

mAb Neutralizantes Únicos

Los análisis de las secuencias de ADNc para las regiones variables completas de las cadenas tanto pesada como ligera para cada mAb revelaron que TNV32 es idéntico a TNV15, TNV118 es idéntico a TNV14 y TNV86 es idéntico a TNV148. Los resultados de ensayo de unión a receptor fueron coherentes con los análisis de secuencia de ADN, es decir, tanto TNV86 como TNV148 eran aproximadamente 4 veces mejores que tanto TNV118 como TNV14 al bloquear la unión de TNF. Por lo tanto, el trabajo posterior se ha enfocado no sólo en los cuatro mAb de TNV únicos, TNV14, TNV15, TNV148 y TNV196.

Relación de los Cuatro mAb

Los resultados de secuencia de ADN revelaron que todos los genes que codificaban las cadenas pesadas de los cuatro mAb de TNV eran altamente homólogos entre sí y parecían haberse obtenido a partir del mismo gen de línea germinal, DP-46 (Figura 2). Además, debido a que todas las secuencias de CDR3 de cadena pesada son tan similares y de la misma longitud, y debido a que todas ellas usan el exón J6, aparentemente se originaron a partir de un solo acontecimiento de transposición de gen VDJ único que después estuvo seguido por cambios somáticos que hicieron a cada mAb único. Los análisis de secuencia de ADN revelaron que había sólo dos genes de cadena ligera diferentes entre los cuatro mAb (Figura 3). Las secuencias codificantes de región variable de cadena ligera en TNV14 y TNV15 son idénticas entre sí y a una secuencia de línea germinal representativa de la familia Vg/38K de cadenas kappa humanas. Las secuencias codificantes de cadena ligera de TNV148 y TNV196 son idénticas entre sí pero difieren de la secuencia de línea germinal en dos posiciones de nucleótidos (Figura 3).

Las secuencias de aminoácidos deducidas de los cuatro mAb revelaron la relación de los mAb reales. Los cuatro mAb contienen cuatro cadenas pesadas diferentes (Figura 4), pero sólo dos cadenas ligeras diferentes (Figura 5). Las diferencias entre las secuencias de mAb de TNV y las secuencias de línea germinal estuvieron en su mayor parte confinadas a los dominios de CDR, pero tres de las cadenas pesadas de mAb también diferían de la secuencia de línea germinal en las regiones flanqueantes (Figura 4). En comparación con las regiones flanqueantes de Ab codificadas por la línea germinal DP-46, TNV14 era idéntico, TNV15 difería en un aminoácido, TNV148 difería en dos aminoácidos y TNV196 difería en tres aminoácidos.

Clonación de ADNc, Mutagénesis Dirigida y Ensamblaje de Plásmidos de Expresión Finales

Clonación de ADNc

Basándose en la secuencia de ADN de las regiones variables amplificadas por PCR, se ordenaron nuevos oligonucleótidos para realizar otro ciclo de amplificación por PCR con el propósito de adaptar la secuencia codificante que se tiene que clonar en vectores de expresión. En el caso de las cadenas pesadas, los productos de este segundo ciclo de PCR se digirieron con enzimas de restricción BsiWI y BstBI y se clonaron en el vector plasmídico L28 (los números de identificación de plásmido se muestran en la Tabla 2). En el caso de las cadenas ligeras, los productos de PCR de segundo ciclo se digirieron con Sall y Afill y se clonaron en el vector plasmídico pBC. Después, los clones individuales se secuenciaron para confirmar que sus secuencias eran idénticas a la secuencia previa obtenida a partir de la secuenciación directa de productos de PCR, lo cual revela el nucleótido más abundante en cada posición en una población potencialmente heterogénea de moléculas.

Mutagénesis Dirigida para Cambiar TNV148

Se observó sistemáticamente que los mAb de TNV148 y TNV196 eran cuatro veces más potentes que el mejor mAb más próximo (TNV14) para neutralizar la bioactividad de TNF α . Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, las secuencias flanqueantes de cadena pesada de TNV148 y TNV196 diferían de las secuencias

flanqueantes de línea germinal. Una comparación de la secuencia de cadena pesada de TNV148 con otros anticuerpos humanos indicó que otros muchos mAb humanos contenían el resto Ile en la posición 28 en el flanco 1 (contando solo la secuencia madura), mientras que el resto Pro en la posición 75 en el flanco 3 era un aminoácido inusual en esa posición.

Una comparación similar de la cadena pesada de TNV196 sugirió que los tres aminoácidos en los que difiere de la secuencia de línea germinal en el flanco 3 pueden ser raros en mAb de humano. Existía una posibilidad de que estas diferencias pudieran volver a TNV148 y TNV196 inmunogénicos si se administraban a seres humanos. Debido a que TNV148 sólo tenía un resto aminoacídico de interés y se creía que este resto no era importante para la unión de TNF, se usó una técnica de mutagénesis dirigida para cambiar un solo nucleótido en la secuencia codificante de cadena pesada de TNV148 (en el plásmido p1753) para que se codificara un resto Ser de línea germinal en lugar del resto Pro en la posición 75. El plásmido resultante se denominó p1760 (véase la Tabla 2). El gen y mAb resultante se denominaron TNV148B para distinguirlos del gen y mAb originales de TNV148 (véase la Figura 5).

Ensamblaje de Plásmidos de Expresión Final

Se prepararon nuevos vectores de expresión de anticuerpo que estaban basados en los genes de cadena pesada y cadena ligera de 12B75 clonados previamente como fragmentos genómicos. Aunque se prepararon diferentes plásmidos de expresión de TNV (véase la Tabla 2), en cada caso las secuencias flanqueantes 5', el promotor y el potenciador de intrón procedían de los genes 12B75 respectivos. Para los plásmidos de expresión de cadena ligera, el intrón J-C completo, la secuencia codificante de región constante y la secuencia flanqueante 3' también procedían del gen de cadena ligera de 12B75. Para los plásmidos de expresión de cadena pesada que dieron como resultado las líneas celulares de producción final (p1781 y p1783, véase más adelante), las secuencias codificantes de región constante de IgG1 humana se obtuvieron a partir del vector de expresión usado previamente de Centocor (P104). De forma importante, las líneas celulares de producción final presentadas en este documento expresan un alotipo diferente (Gm(f+)) de los mAb de TNV obtenidos de hibridoma originales (G1m(z)). Esto se debe a que el gen de cadena pesada de 12B75 obtenido de los ratones GenPharm codifica un resto Arg en el extremo C terminal del dominio CH1 mientras que el vector de expresión de IgG1 de Centocor P104 codifica un resto Lys en esa posición. Se prepararon otros plásmidos de expresión de cadena pesada (por ejemplo, p1786 y p1788) en los que el intrón J-C, la secuencia codificante de región constante completa y la secuencia flanqueante 3' se obtuvieron a partir del gen de cadena pesada de 12B75, pero las líneas celulares transfectadas con esos genes no se seleccionaron como líneas celulares de producción. Los vectores se diseñaron de forma cuidadosa para permitir la clonación de una etapa de regiones V amplificadas por PCR futuras que podrían dar como resultado plásmidos de expresión finales.

Los ADNc de región variable amplificados por PCR se transfirieron de los vectores L28 o PBC a vectores de fase intermedia de 12.875 bases que proporcionaron la región promotora y parte del intrón J-C (véanse en la Tabla 2 los números de identificación de plásmido). Los fragmentos de restricción que contenían la mitad 5' de los genes de anticuerpo después se transfirieron desde estos vectores de fase intermedia a los vectores de expresión final que proporcionaron la mitad 3' de los genes respectivos para formar los plásmidos de expresión final (véanse en la Tabla 2 los números de identificación de plásmido).

Transfecciones y Subclonaciones Celulares

Los plásmidos de expresión se linealizaron mediante digestión de restricción o los insertos de gen de anticuerpo en cada plásmido se purificaron separándose de las estructuras de los plásmidos. Las células de mieloma de ratón SP2/0 y 653 se transfectaron con el ADN de cadena pesada y ligera mediante electroporación. Se realizaron quince transfecciones diferentes, la mayoría de las cuales eran únicas como se definía por el Ab, las características específicas de los genes de Ab, si los genes estaban en plásmidos completos linealizados o insertos de genes purificados y la línea de célula huésped (resumida en la Tabla 3). Los sobrenadantes celulares de los clones resistentes a ácido micofenólico se ensayaron para determinar la presencia de IgG humana mediante ELISA y se cuantificaron usando rTNV148B purificado como una curva patrón de referencia.

Líneas Celulares rTNV148B de Producción más Alta

Se subclonaron diez de las líneas parentales 653 mejores productoras de la transfección 2 de rTNV148B (produjeron 5-10 µg/ml en cultivos de 24 pocillos agotados) para seleccionar las líneas celulares mejores productoras y para preparar una población celular más homogénea. Dos de estos subclones de la línea parental 2.320, 2.320-17 y 2.320-20 produjeron aproximadamente 50 µg/ml en cultivos de 24 pocillos agotados, que era un aumento de 5 veces sobre su línea parental. Un segundo ciclo de subclonación de líneas subclonadas 2.320-17 y 2.320-20 condujo a

Tabla 3. Sumario de Transfecciones Celulares. Se muestran los números de identificación de los plásmidos de cadena pesada y ligera que codifican cada mAb. En el caso de transfecciones hechas con insertos de genes de mAb purificados, se incluyó el plásmido p13 (pSV2gpt) como fuente del marcador de selección gpt. Las regiones constantes de cadena pesada estaban codificadas por el mismo vector de expresión de IgG1 humano usado para codificar Remicade (“antiguo”) o por las regiones constantes contenidas dentro del gen de cadena pesada de 12B75 (GenPharm/Medarex) (“nuevo”). H1/L2 se refiere a un mAb “nuevo” conformado por la cadena pesada de TNV14 y la cadena ligera de TNV148. Los plásmidos p1783 y p1801 sólo difieren en cuánto del intrón J-C contienen sus genes de cadena pesada. Los números de transfección, que definen el primer número de los nombres genéricos para los clones celulares, se muestran en la derecha. Las líneas celulares productoras de rTNV148B C466 (A, B, C, D) y C467A descritas en este documento se obtuvieron a partir del número de transfección 2 y 1, respectivamente. La línea de células productoras de rTNV14 C476A se obtuvo a partir del número de transfección 3.

mAb	Plásmidos HC/LC/gpt	Vector de HC	Formato ADN	Nº de Transfección	
				de Sp2/0	652
rTNV148B	1783/1776	Antiguo	Lineal	1	2
rTNV14	1781/1775	Antiguo	Lineal	3	-
rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0		19 µg/ml

Caracterización de Líneas Celulares Subclonadas

Para caracterizar más cuidadosamente las características de crecimiento de línea celular y determinar los niveles de producción de mAb en una escala mayor, se realizaron análisis de curvas de crecimiento usando cultivos de T75. Los resultados demostraron que cada una de las cuatro series C466 de líneas celulares alcanzaron una densidad celular pico entre $1,0 \times 10^6$ y $1,25 \times 10^6$ células/ml y niveles de acumulación de mAb máximos de entre 110 y 140 µg/ml (Figura 7). Por el contrario, el subclón SP2/0 mejor productor, C467A, alcanzó la densidad celular máxima de $2,0 \times 10^6$ células/ml y los niveles de acumulación de mAb máximos de 25 µg/ml (Figura 7). No se realizó un análisis de curva de crecimiento en la línea de células productoras de rTNV14, C476A.

Se realizó un análisis de curvas de crecimiento adicional para comparar los índices de crecimiento en concentraciones diferentes de selección con MHX. Esta comparación estaba impulsada por observaciones recientes de que las células C466 cultivadas en ausencia de MHX parecían crecer más rápido que las mismas células cultivadas en la cantidad normal de MHX (1X). Debido a que las concentraciones citotóxicas de compuestos tales como ácido micofenólico tienden a

Para medirse sobre órdenes de magnitud, se consideró posible que el uso de una concentración menor de MHX podría dar como resultado tiempos de duplicación de células significativamente más rápidos sin sacrificar la estabilidad de producción de mAb. Las líneas celulares C466A y C466B se cultivaron en: sin MHX, MHX 0,2X o MHX 1X. Los recuentos de células vivas se tomaron en intervalos de 24 horas durante 7 días. Los resultados revelaron un índice de crecimiento celular dependiente de la concentración de MHX (Figura 8). La línea celular C466A mostró un tiempo de duplicación de 25,0 horas en MHX 1X pero de sólo 20,7 horas sin MHX. De forma similar, la línea celular C466B mostró un tiempo de duplicación de 32,4 horas en MHX 1X pero sólo de 22,9 horas sin MHX. Más importante, los tiempos de duplicación para ambas líneas celulares en MHX 0,2X fueron más similares a lo que se ha observado sin MHX que en MHX 1X (Figura 8). Esta observación suscita la posibilidad de que el rendimiento celular potenciado en biorreactores, para los que los tiempos de duplicación son un parámetro importante, se podría conseguir usando menos MHX. Sin embargo, aunque los resultados de ensayo de estabilidad (véase más adelante) sugieren que la línea celular C466D es capaz de producir de forma estable rTNV148B durante al menos 60 días incluso sin que esté presente MHX, el ensayo de estabilidad también mostró niveles de producción de mAb más altos cuando las células se cultivaron en presencia de MHX en comparación con la ausencia de MHX.

Para evaluar la producción de mAb de las diversas líneas celulares durante un período de aproximadamente 60 días, se realizaron ensayos de estabilidad en cultivos que contenían o no contenían, selección con MHX. No todas las líneas celulares mantuvieron una alta producción de mAb. Después de apenas dos semanas de cultivo, el clon C466A estaba produciendo aproximadamente el 45% menos que al comienzo del estudio. La producción de clon C466B también parecía reducirse de forma significativa. Sin embargo, los clones C466C y C466D mantuvieron una producción bastante estable, mostrando C466D los niveles de producción absolutos más elevados (Figura 9).

Conclusión

A partir de un panel inicial de ocho mAb humanos frente a TNF α , se seleccionó TNV148B como preferido basándose en varios criterios que incluían la secuencia de la proteína y la potencia de neutralización de TNF, así como TNV14. Se prepararon líneas celulares que producían más de 100 µg/ml de rTNV148B y 19 µg/ml de rTNV14.

Ejemplo 4: Estudio de Ratones Artríticos Usando Anticuerpos Anti-TNF y Controles Usando una Sola Inyección en Embolada.

5 Aproximadamente a 4 semanas de edad, los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en género y peso corporal, a uno de nueve grupos de tratamiento y se trataron con una sola dosis intraperitoneal en embolada de PBS de Dulbecco (D-PBS) o un anticuerpo anti-TNF de la presente invención (TNV14, TNV148 o TNV196) a 1 mg/kg o 10 mg/kg.

10 **RESULTADOS:** Cuando los pesos se analizaron como un cambio desde antes de administrar la dosis, los animales tratados con 10 mg/kg de cA2 mostraron una ganancia de peso sistemáticamente mayor que los animales tratados con D-PBS a lo largo de todo el estudio. Esta ganancia de peso fue significativa en las semanas 3-7. Los animales tratados con 10 mg/kg de TNV148 también consiguieron una ganancia de peso significativa en la semana 7 del estudio (Véase la Figura 10).

15 Las Figuras 11A-C representan la progresión de gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico. El índice artrítico del grupo tratado con 10 mg/kg de cA2 fue menor que el del grupo de control de D-PBS comenzando en la semana 3 y continuando a lo largo del resto del estudio (semana 7). Los animales tratados con 1 mg/kg de TNV14 y los animales tratados con 1 mg/kg de cA2 no mostraron reducción significativa en AI después de la semana 3 cuando se comparaban con el grupo tratado con D-PBS. No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento de 10 mg/kg cuando cada uno se comparó con los otros de dosis similar (10 mg/kg de cA2 en comparación con 10 mg/kg de TNV14, 148 y 196). Cuando se compararon los grupos de tratamiento de 1 mg/kg, el 1 mg/kg de TNV148 mostró un AI significativamente menor que el 1 mg/kg de cA2 a las 3, 4 y 7 semanas. El 1 mg/kg de TNV148 también fue significativamente menor que el 1 mg/kg del grupo tratado con TNV14 a las 3 y 4 semanas. Aunque TNV196 mostró una reducción significativa en AI hasta la semana 6 del estudio (cuando se comparaba con el grupo tratado con D-PBS), TNV148 fue el único tratamiento de 1 mg/kg que permaneció significativo a la finalización del estudio.

Ejemplo 5: Estudio de Ratones Artríticos Usando Anticuerpos Anti-TNF y Controles como Múltiples Dosis en Embolada

30 Aproximadamente a las 4 semanas de edad los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en el peso corporal, a uno de 8 grupos de tratamiento y se trataron con una dosis en embolada intraperitoneal de artículo de control (D-PBS) o anticuerpos (TNV14, TNV148) a 3 mg/kg (semana 0). Las inyecciones se repitieron en todos los animales en las semanas 1, 2, 3 y 4. Los grupos 1-6 se evaluaron para ensayar la eficacia del artículo. Las muestras de suero, obtenidas a partir de los animales en los grupos 7 y 8 se evaluaron para inducción de respuesta inmune y eliminación farmacocinética de TNV14 o TNV148 en las semanas 2, 3 y 4.

35 **RESULTADOS:** No se observaron diferencias significativas cuando los pesos se analizaron como un cambio desde antes de la administración de la dosis. Los animales tratados con 10 mg/kg de cA2 mostraron una ganancia de peso sistemáticamente mayor que los animales tratados con D-PBS a lo largo de todo el estudio. (Véase la Figura 12).

40 Las Figuras 13A-C representan la progresión de la gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico. El índice artrítico del grupo tratado con 10 mg/kg de cA2 fue significativamente menor que el grupo de control de D-PBS comenzando en la semana 2 y continuando a lo largo del resto del estudio (semana 5). Los animales tratados con 1 mg/kg o 3 mg/kg de Ca2 y los animales tratados con 3 mg/kg de TNV14 no consiguieron ninguna reducción significativa en AI en ningún momento a lo largo de todo el estudio cuando se comparaban con el grupo de control d-PBS. Los animales tratados con 3 mg/kg de TNV148 mostraron una reducción significativa cuando se compararon con el grupo tratado con d-PBS comenzando en la semana 3 y continuando hasta la semana 5. Los animales tratados con 10 mg/kg de cA2 mostraron una reducción significativa del AI cuando se compararon con las dos dosis inferiores (1 mg/kg y 3 mg/kg) de cA2 en las semanas 4 y 5 del estudio y también fue significativamente menor que en los animales tratados con TNV14 en las semanas 3-5. Aunque aparentemente no había diferencias significativas entre ninguno de los grupos de tratamiento de 3 mg/kg, el AI para los animales tratados con 3 mg/kg de TNV14 era significativamente mayor en algunos puntos de tiempo que el de 10 mg/kg, mientras que los animales tratados con TNV148 no eran significativamente diferentes de los animales tratados con 10 mg/kg de cA2.

Ejemplo 6: Estudio de Ratones Artríticos Usando Anticuerpos Anti-TNF y Controles como una Sola Dosis Intraperitoneal en Embolada.

60 Aproximadamente a las 4 semanas de edad los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en el género y en el peso corporal, a uno de 6 grupos de tratamiento y se trataron con una sola dosis intraperitoneal en embolada de anticuerpo (Ca2 o TNV148) a 3 mg/kg o 5 mg/kg. Este estudio utilizó los grupos de control de D-PBS y 10 mg/kg de cA2.

65

5 Cuando los pesos se analizaron como un cambio desde antes de administrar la dosis, todos los tratamientos consiguieron ganancias de peso similares. Los animales tratados con 3 ó 5 mg/kg de TNV148 o 5 mg/kg de cA2 ganaron una cantidad significativa de peso más temprano en el estudio (en las semanas 2 y 3). Únicamente los animales tratados con TNV148 mantuvieron una ganancia de peso significativa en los puntos de tiempo posteriores. Los animales tratados tanto con 3 como 5 mg/kg de TNV148 mostraron un resultado significativo a las 7 semanas y los animales de 3 mg/kg de TNV148 mostraron un resultado significativamente elevado aún a las 8 semanas después de la inyección. (Véase la Figura 14).

10 La Figura 15 representa la progresión de la gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico. Todos los grupos de tratamiento mostraron alguna protección en los puntos de tiempo más tempranos, mostrando el de 5 mg/kg de Ca2 y el de 5 mg/kg de TNV148 reducciones significativas en AI en las semanas 1-3 y mostrando todos los grupos de tratamiento una reducción significativa en la semana 2. Posteriormente en el estudio los animales tratados con 5 mg/kg de cA2 mostraron alguna protección, con reducciones significativas en las semanas 4, 6 y 7. La dosis baja (3 mg/kg) tanto de cA2 como de TNV148 mostró reducciones significativas en la semana 6 y todos los grupos de tratamiento mostraron reducciones significativas en la 7. Ninguno de los grupos de tratamiento fue capaz de mantener una reducción significativa a la finalización del estudio (semana 8). No hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos de tratamiento (excluyendo el grupo de control de solución salina) en ningún punto del tiempo.

20 **Ejemplo 7: Estudio de Ratones Artríticos Usando Anticuerpos Anti-TNF y Controles Como una Sola Dosis Intraperitoneal en Embolada entre Anticuerpo Anti-TNF y Anticuerpo Anti-TNF Modificado.**

25 Para comparar la eficacia de una sola dosis intraperitoneal de TNV148 (obtenido a partir de células de hibridoma) y rTNV148B (obtenido a partir de células transfectadas). Aproximadamente a las 4 semanas de edad, los ratones de estudio Tg197 se asignaron, basándose en el género y en el peso corporal, a uno de 9 grupos de tratamiento y se trataron con una sola dosis intraperitoneal en embolada de PBS de Dulbecco (D-PBS) o anticuerpo (TNV148, RT1 VV148B) a 1 mg/kg.

30 Cuando los pesos se analizaron como un cambio desde antes de administrar la dosis, los animales tratados con 10 mg/kg de cA2 mostraron una ganancia de peso sistemáticamente mayor que los animales tratados con D-PBS a lo largo de todo el estudio. Esta ganancia de peso fue significativa en las semanas 1 y en las semanas 3-8. Los animales tratados con 1 mg/kg de TNV148 también consiguieron una ganancia de peso significativa en las semanas 5, 6 y 8 del estudio. (Véase la Figura 16).

35 La Figura 17 representa la progresión de la gravedad de la enfermedad basándose en el índice artrítico. El índice artrítico del grupo tratado con 10 mg/kg de cA2 fue inferior que el del grupo de control de D-PBS comenzando en la semana 4 y continuando a lo largo del resto del estudio (semana 8). Tanto el grupo tratado con TNV148 como el grupo tratado con 1 mg/kg de cA2 mostraron una reducción significativa en AI en la semana 4. Aunque un estudio previo (P-099-017) mostró que TNV148 era ligeramente más eficaz para reducir el Índice Artrítico después de una sola inyección intraperitoneal en embolada de 1 mg/kg, este estudio mostró que el AI de las dos versiones de los grupos tratados con anticuerpo TNV fue ligeramente mayor. Aunque (con excepción de la semana 6) el grupo tratado con 1 mg/kg de cA2 no estaba significativamente aumentado cuando se comparaba con el grupo de 10 mg/kg de cA2 y los grupos tratados con TNV148 fueron significativamente mayores en la semana 7 y 8, no hubo diferencias significativas en AI entre 1 mg/kg de cA2, 1 mg/kg de TNV148 y 1 mg/kg TNV148B en ningún punto en el estudio.

50 <110> Centocor Ortho Biotech Inc.
 <120> ANTICUERPOS ANTI-TNF ANTIBODIES, COMPOSICIONES, METODOS Y USOS
 <130> P055221EP
 <150> US 60/223,360
 <151> 2000-08-07
 <150> US 60/236,826
 <151> 2000-09-29
 <150> US 09/920,137
 <151> 2001-08-01
 <160> 15
 <170> PatentIn Ver 2.0
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

65

ES 2 607 679 T3

Arg Tyr Thr Met His
1 5

5 <210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

10 Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

20 Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

25 <210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

30 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

35 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

40 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

45 <210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

50 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10

55 <210> 7
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

60

65

ES 2 607 679 T3

5
 10
 15
 20
 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Asp Arg Gly Ile Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val
 115

30
 <210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

35
 40
 45
 50
 55

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

60
 <210> 9
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

65

ES 2 607 679 T3

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

<210> 10
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10 agatatacta tgcac 15
 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11 gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact ccgtgaagg c 51
 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12 gaggccggg gatcgatgc tttgatatc 30
 <210> 13
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13 ctctctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cc 42
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 14 gatgcatcca acagggcc
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 15 cagcagcgta gcaactggcc t 21

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo específico para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que tiene tres CDRs de la cadena pesada y tres CDRs de la cadena ligera o un fragmento que enlaza con los mismos, en donde

5

las tres CDRs de la cadena pesada tienen la secuencia de aminoácidos de:

CDRH1: SYAMH;
 CDRH2: FMSYDGSNKKYADSVKG;
 CDRH3: DRGIAAGGNYYYYGMDV; y

10

las tres CDRs de la cadena ligera tienen la secuencia de aminoácidos de:

CDRL1: RASQSVYSYLA;
 CDRL2: DASNRAT;
 CDRL3: QQRSNWPPFT;

15

para su uso en el tratamiento de colitis ulcerosa.

2. El anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación, en donde dicho anticuerpo es humano.

20

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con esa reivindicación, en donde:

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos:

25

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGKGL.
 EWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
 TAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS; y

30

la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRL IYDASNRATGIPARFSGSGS-
 GTDFTLTISLPEPDAVYYCQQRSNWP PFTFGPGTKVDIK; y

35

el anticuerpo es IgG1k.

4. Una composición que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo o diligente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de colitis ulcerosa.

40

5. Una composición que comprende un anticuerpo de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de colitis ulcerosa, que comprende adicionalmente al menos uno seleccionado de un antagonista del TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un nutritivo, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoietina, un ilgrastim, un sargramostim, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un cicloplégico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromolino, una epinefrina o análogo, dornasa alfa, una citoquina y un antagonista de citoquinas.

55

60

65

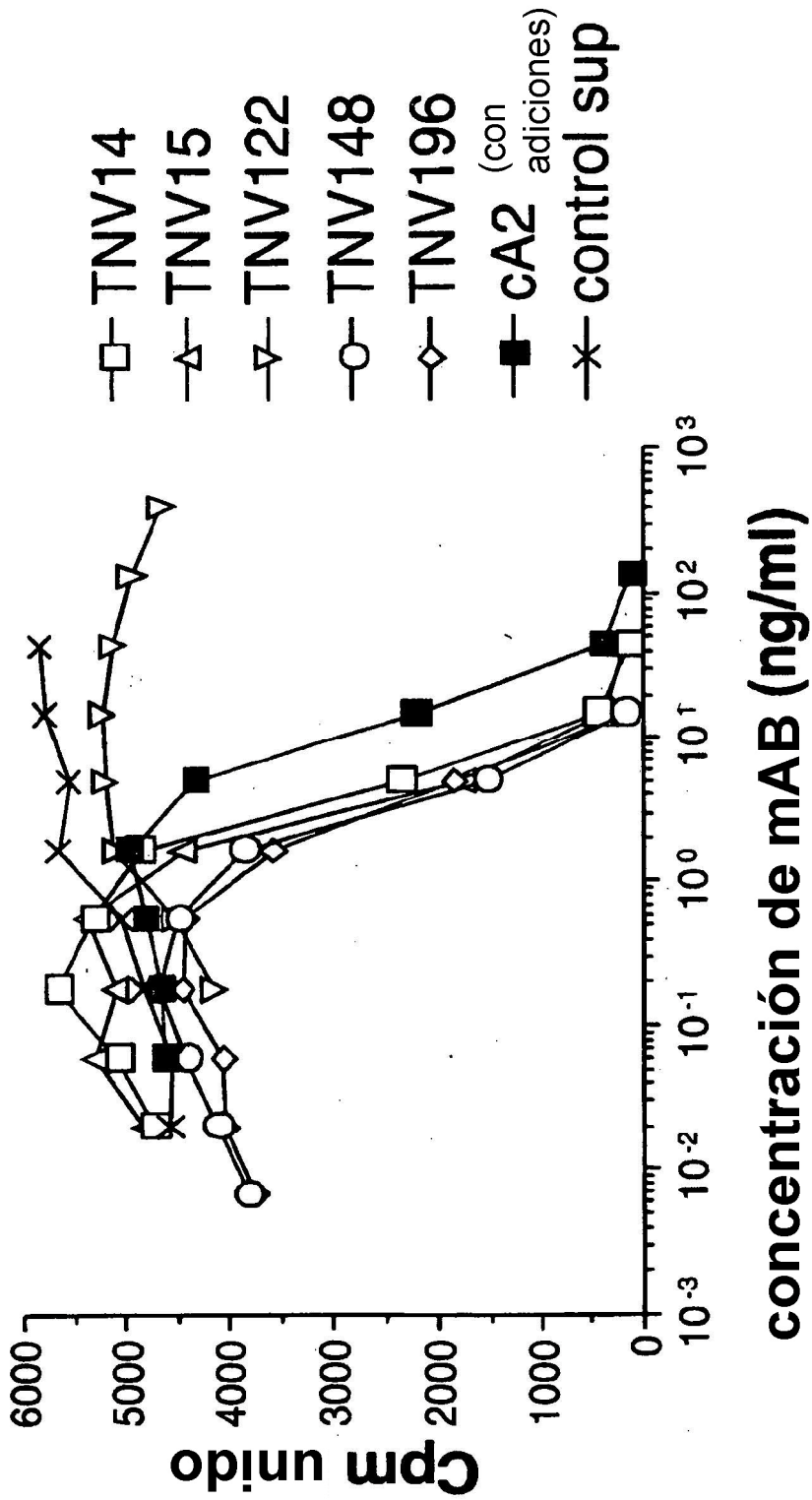


FIGURA 1

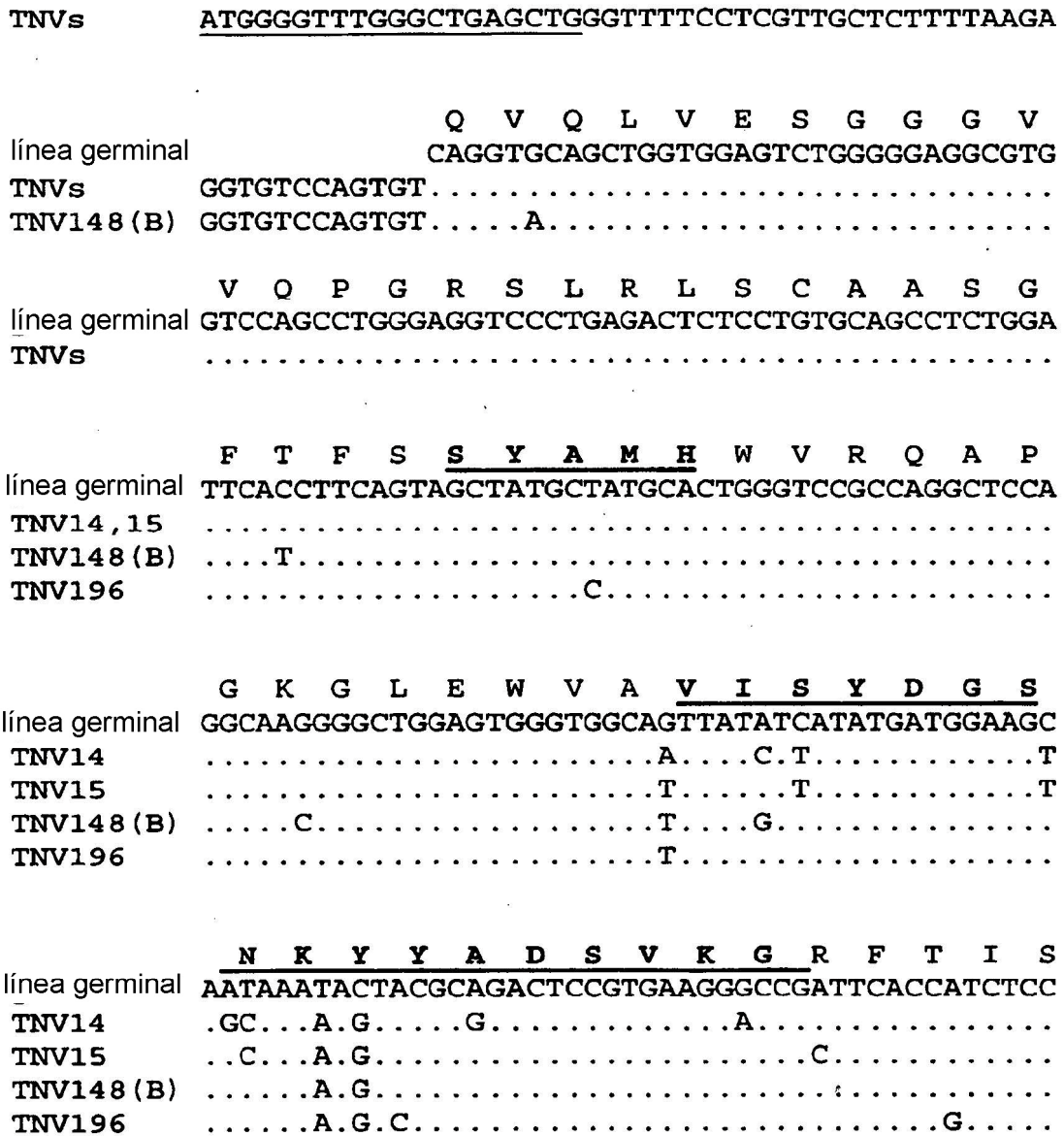


FIGURA 2A

	R D N S K N T L Y L Q M N S L
línea germinal	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
TNV14
TNV15G.....
TNV148C.....
TNV148B
TNV196T.....

	R A E D T A V Y Y C A R
línea germinal	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
TNV14, 15GATCGAGGT
TNV148 (B)A
TNV196T.....

	<u>Y Y Y Y Y G M D V W</u>
línea germinal	TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
TNV14	ATATCAGCAGGTGGAA.....
TNV15	G.C.....A.T..T.....
TNV148 (B)	...G.....A.....
TNV196	..TGG.....A.....

	G Q G T T V T V S S
línea germinal	GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
TNV14	..C.....
TNV15	..C.....
TNV148 (B)	..C.....
TNV196	..C..G.....

FIGURA 2B

TNVs ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC

E I V L T Q S P A T
línea germinal **GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC**
TNVs **CCAGATAACCACCGGA.....**

L S L S P G E R A T L S C R A
línea germinal **CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC**
TNVs **.....**

S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
línea germinal **AGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAACT**
TNV14, 15 **.....**
TNV148, 196 **.....TA.....**

G Q A P R L L I Y D A S N R A
línea germinal **GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC**
TNVs **.....**

T G I P A R F S G S G S G T D
línea germinal **ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC**
TNVs **.....**

F T L T I S S L E P E D F A V
línea germinal **TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTT**
TNVs **.....**

Y Y C Q Q R S N W P P F T F G
línea germinal **TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC**
TNVs **.....A.....**

P G T K V D I K R
línea germinal **CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT**
TNVs **.....**

FIGURA 3

línea germinal	<u>MGFGLSWVFLVALLRGVQC</u>	señal
TNVs	
línea germinal	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	FR1
TNVs	
TNV148 (B)I..	
línea germinal	SYAMH	CDR1
TNVs	
línea germinal	WVRQAPGKGLEWVA	FR2
TNVs	
TNV148 (B)N.....	
línea germinal	VISYDGSNKYYADSVKG	CDR2
TNV14	I.L....S.K.....D	
TNV15	F.L....K.....	
TNV148 (B)	FM.....K.....	
TNV196	F.....KS.....	
línea germinal	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	FR3
TNV14	
TNV15A.....	
TNV148P.....	
TNV148B	
TNV196	...V.....F.....F.....	
línea germinal	-----YYYYYGMDV	
TNV14	DRGISAGGN.....	CDR3
TNV15	...V...N.....	
TNV148 (B)	...A...N.....	
TNV196	...G...N.....	
línea germinal	WGQGT T VTVSS	J6
TNVs	

FIGURA 4

TNVs	MEAPAQLLELLLLLWLPDTTG	señal
línea germinal	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1
TNVs	
línea germinal	RASQSVSSYLA	CDR1
TNV14	
TNV15	
TNV148 (B)Y.....	
TNV196Y.....	
línea germinal	WYQQKPGQAPRLLIY	FR2
TNVs	
línea germinal	DASNRAT	CDR2
TNVs	
línea germinal	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	FR3
TNVs	
línea germinal	QQRSNWPPFT	CDR3
TNVs	
línea germinal	FGPGTKVDIK	J3
TNVs	

FIGURA 5

p1776

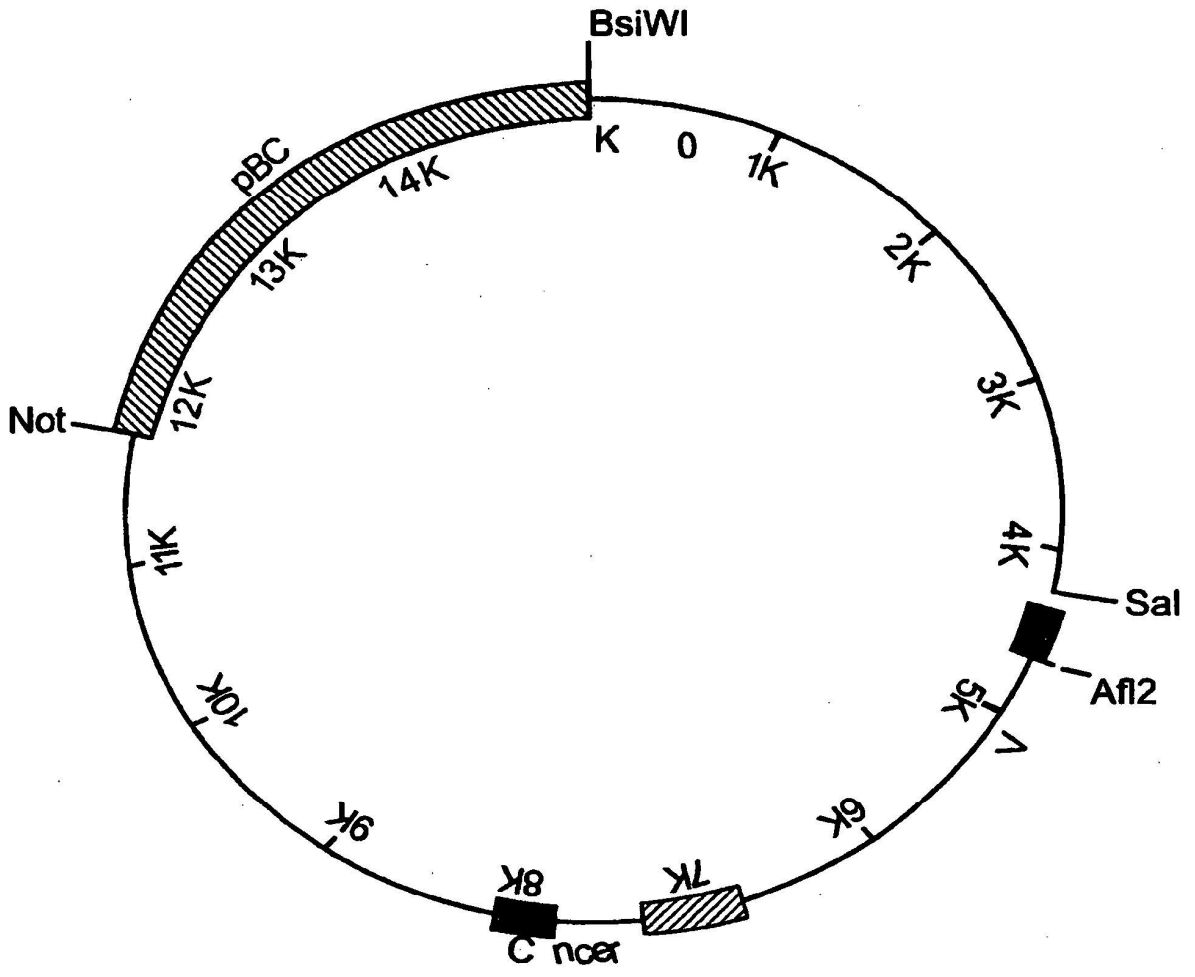


FIGURA 6

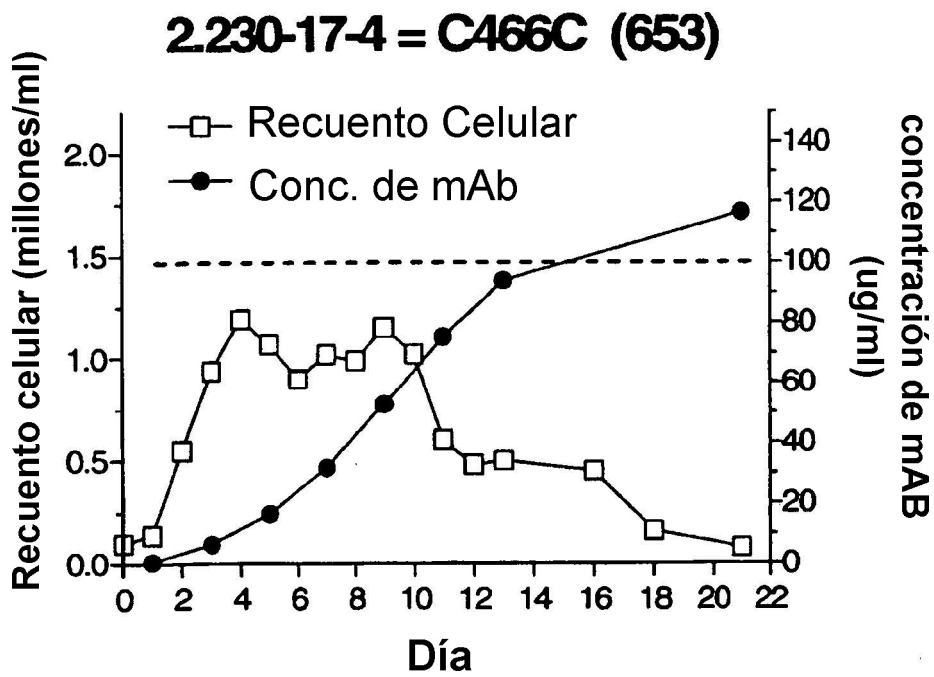
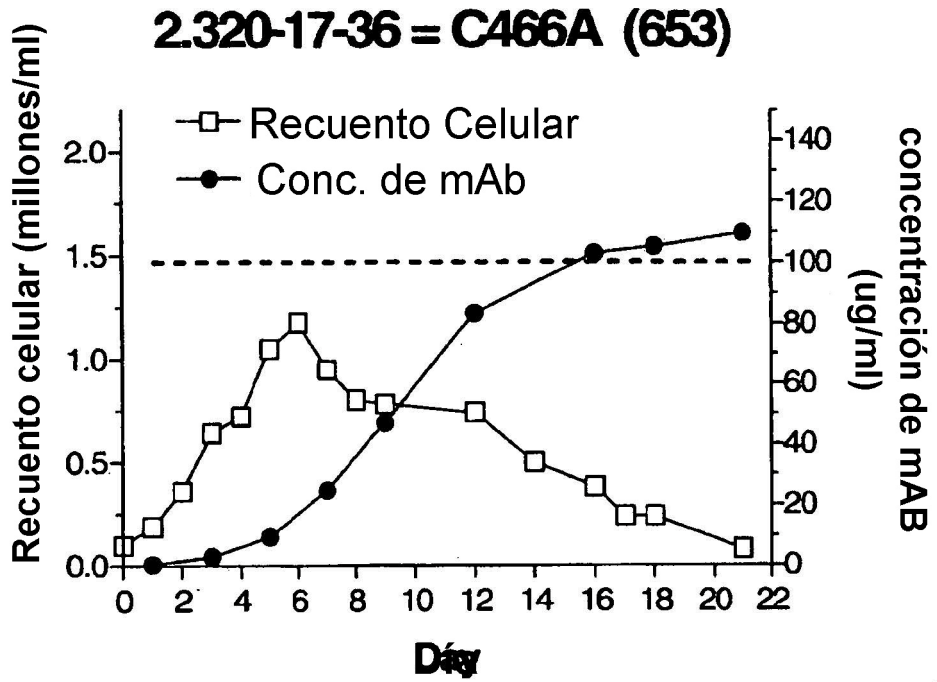


FIGURA 7

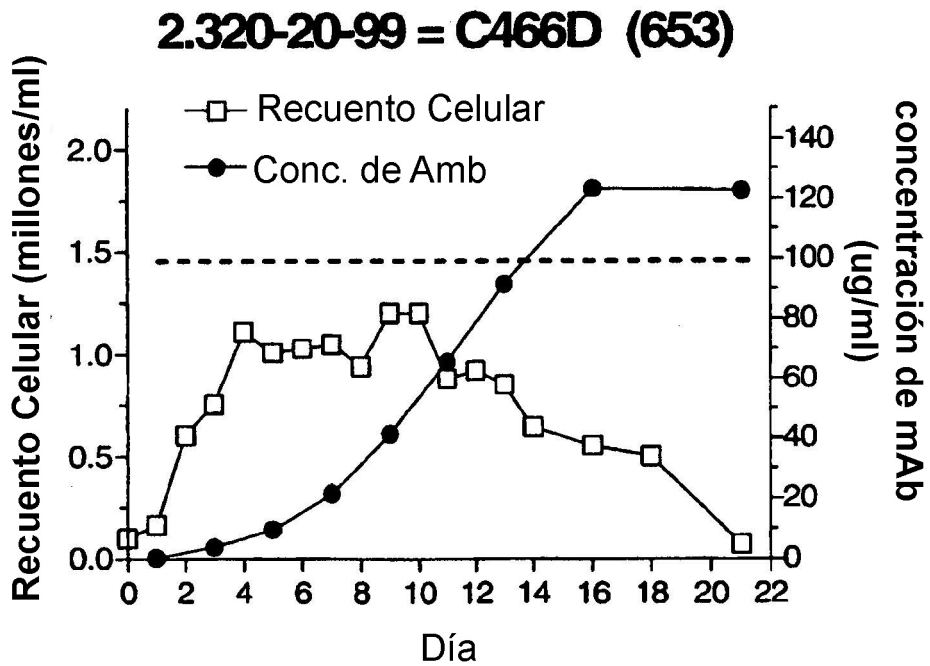
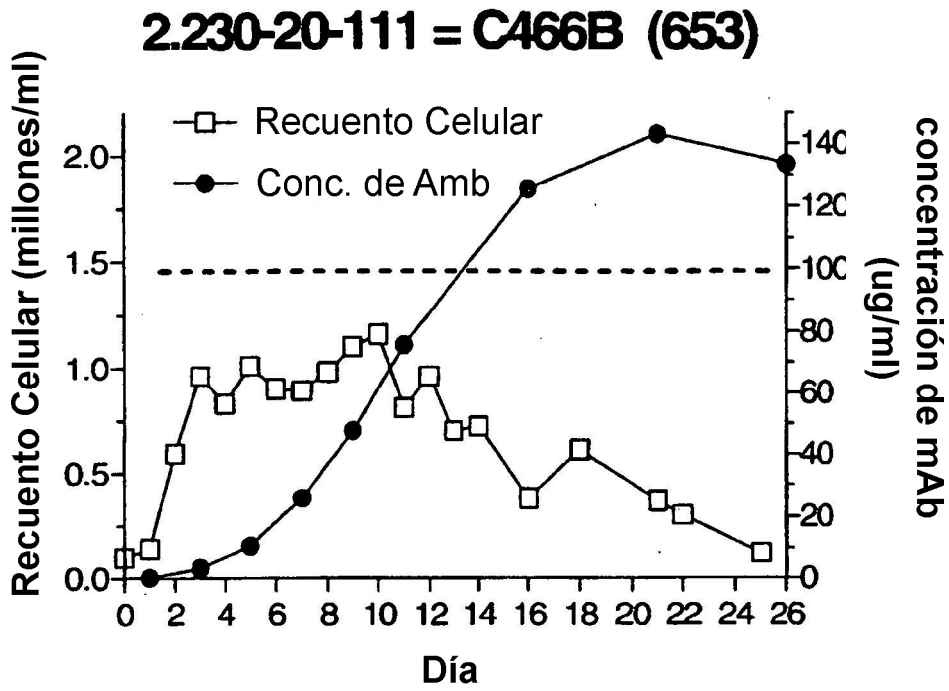


FIGURA 7 (cont.)

1.73-12-122 = C467A (SP2/0)

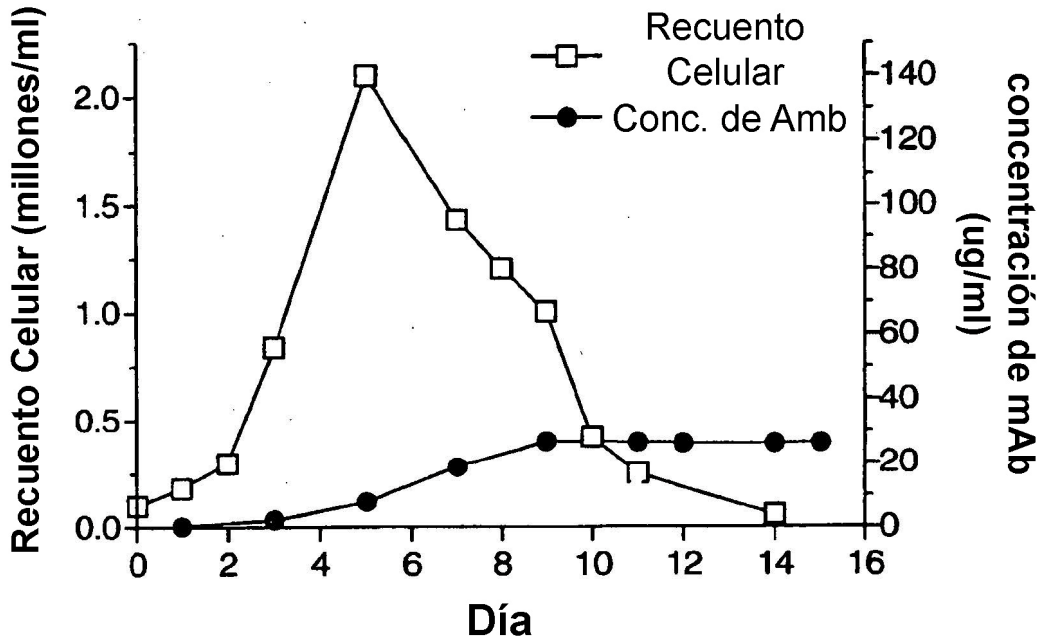


FIGURA 7 (cont.)

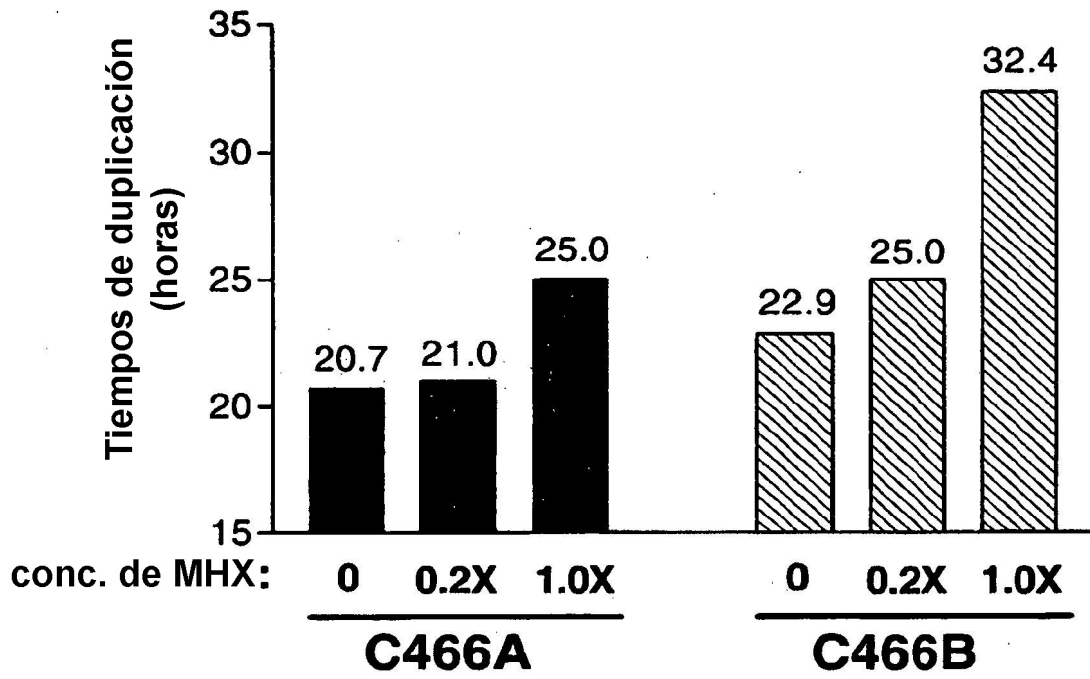
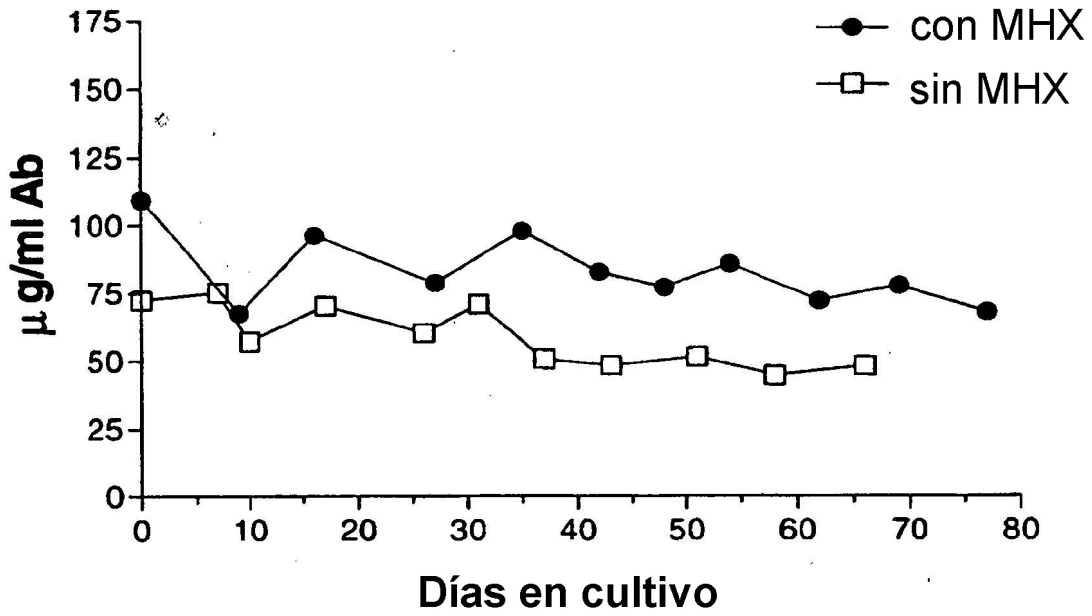


FIGURA 8

C466C



C466D

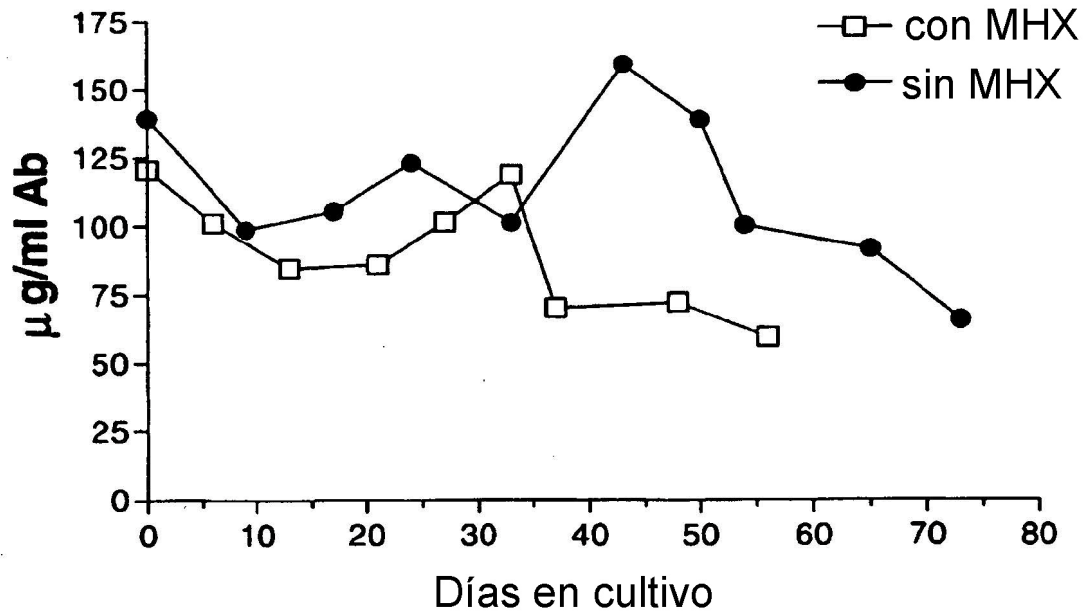


FIGURA 9

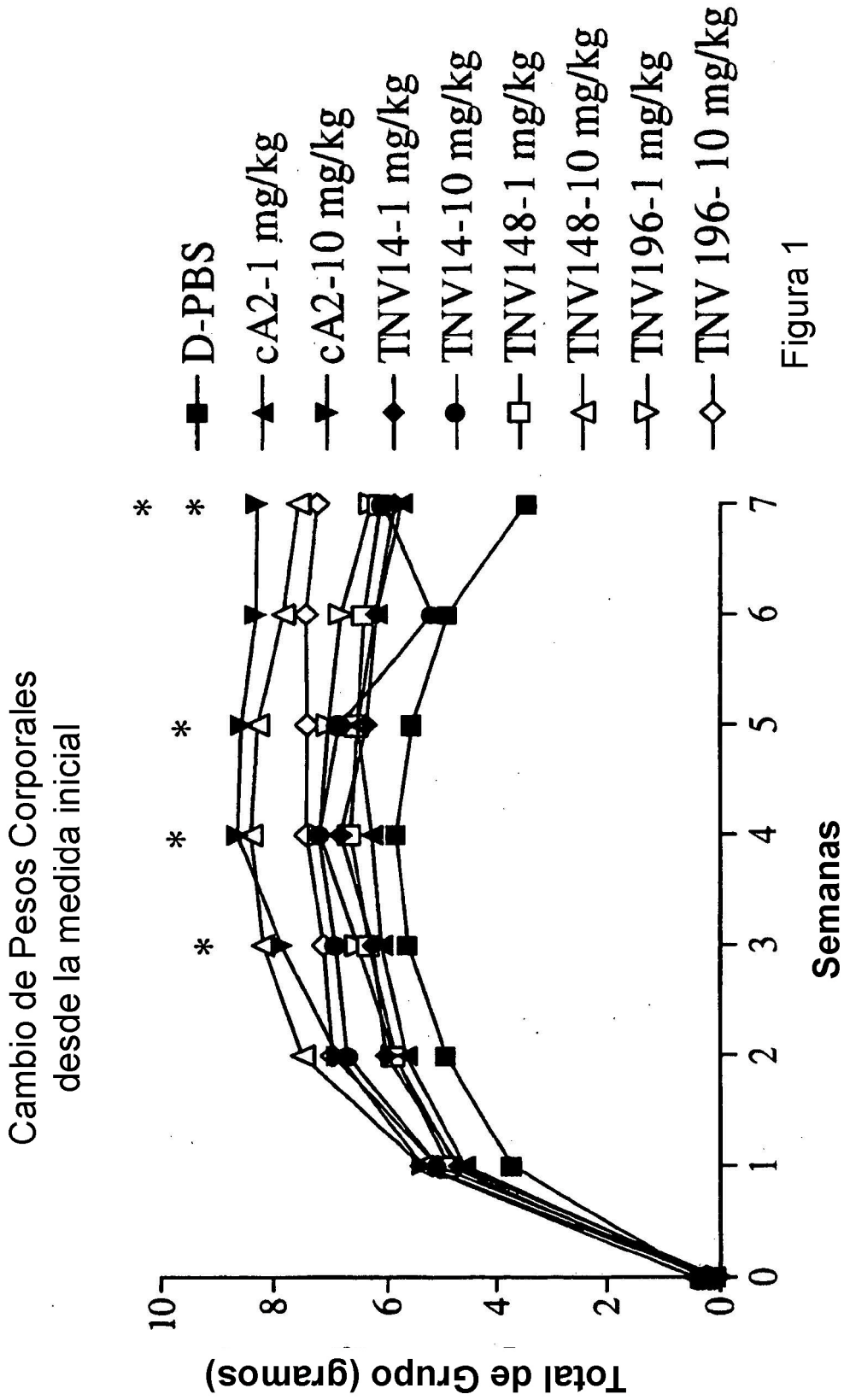


FIGURA 10

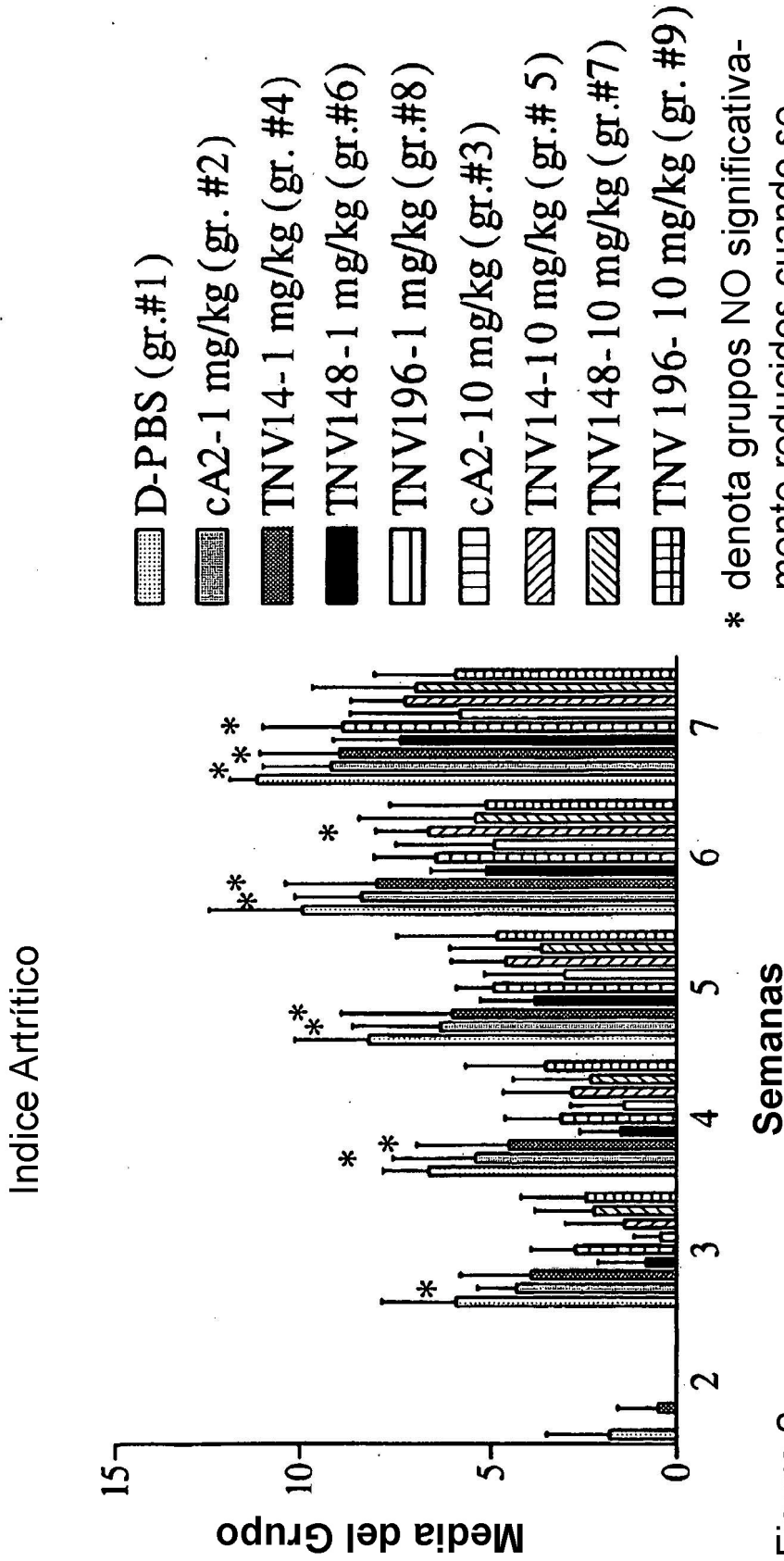


Figura 2

FIGURA 11A

* denota grupos NO significativamente reducidos cuando se compara con el Grupo de D-PBS. Todos los Grupos no marcados son significativos ($p < 0,050$).

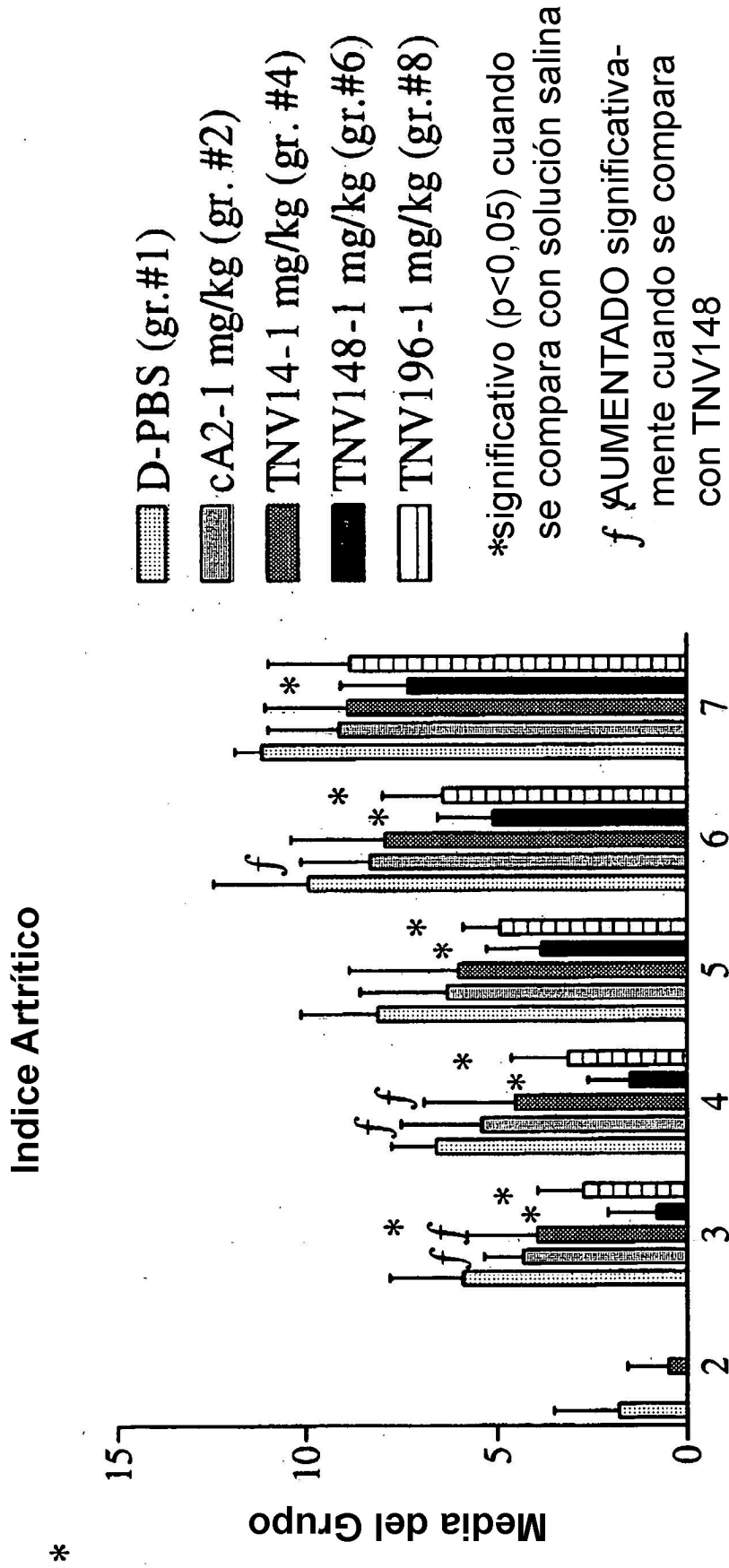


Figura 3 FIGURA 11B

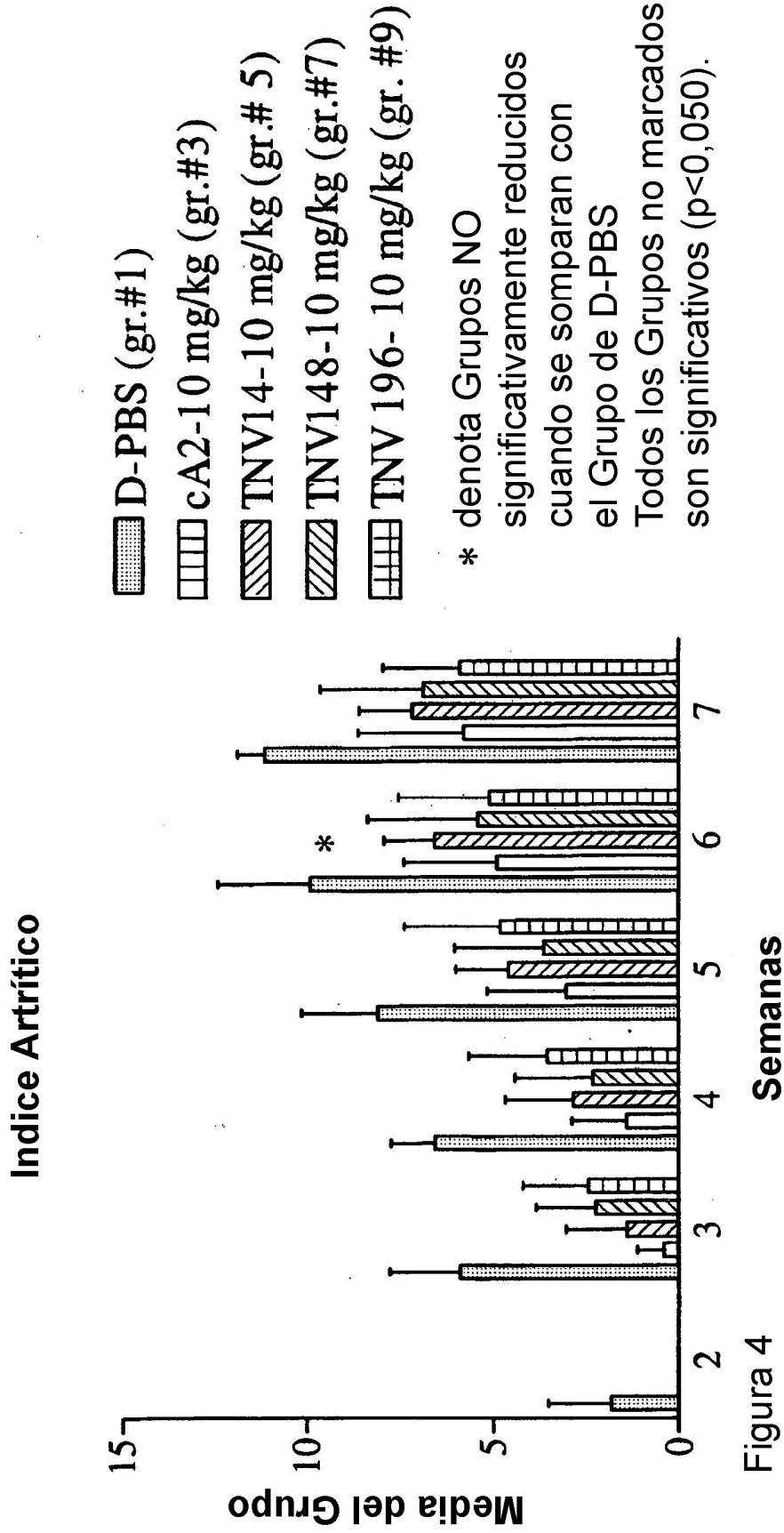


Figura 4

FIGURA 11C

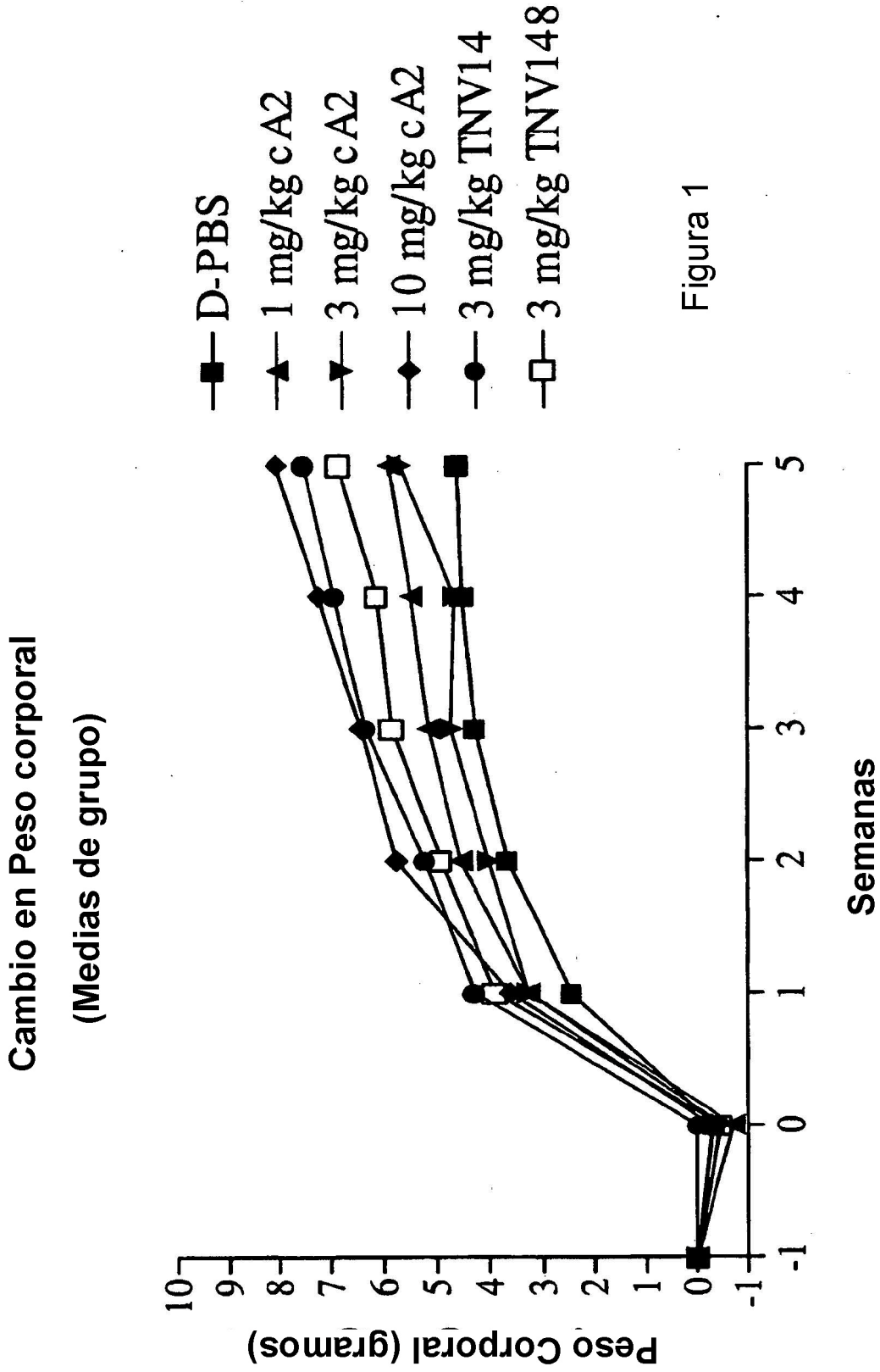


Figura 1

FIGURA 12

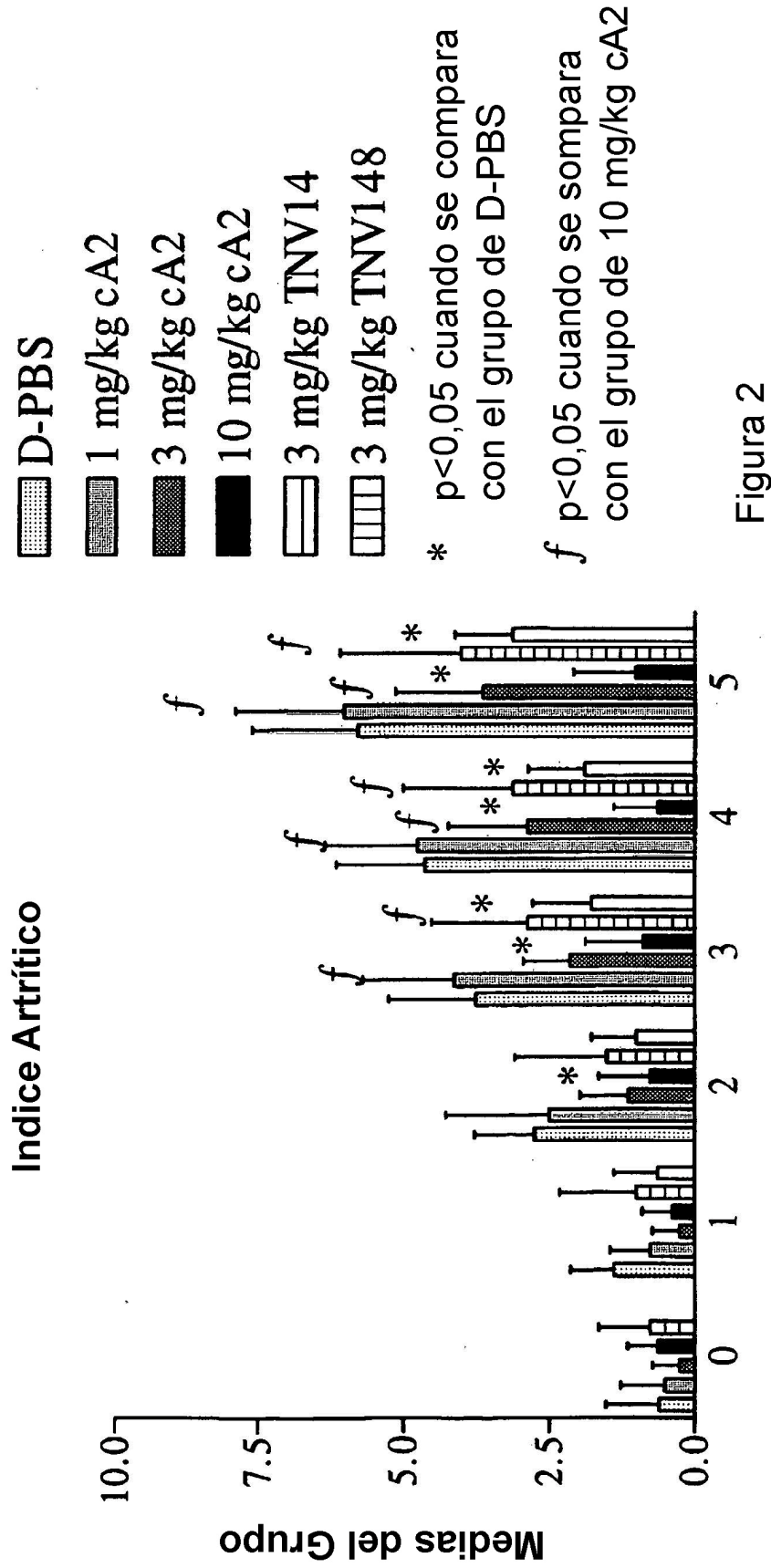


Figura 2

FIGURA 13A

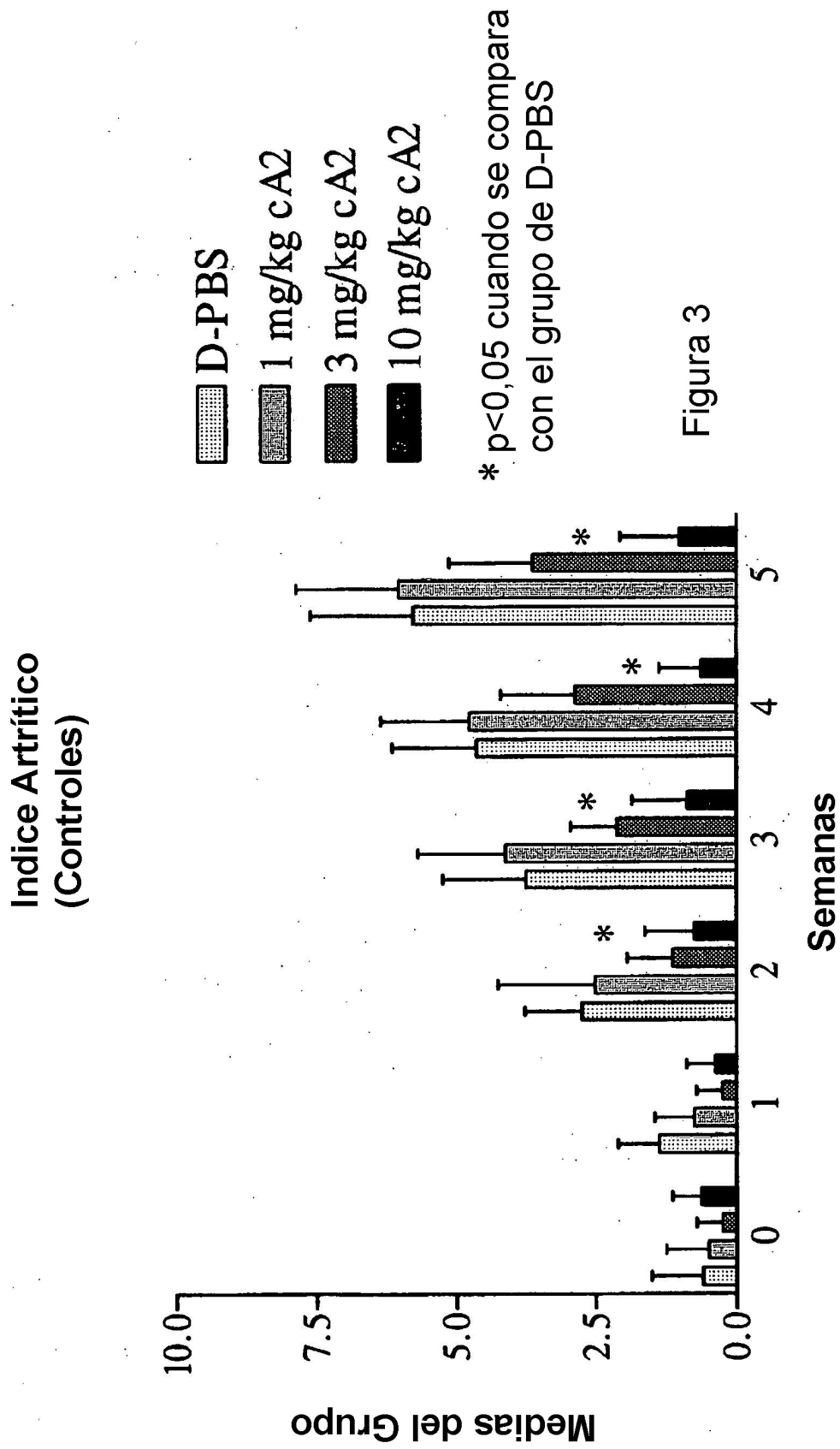


FIGURA 13B

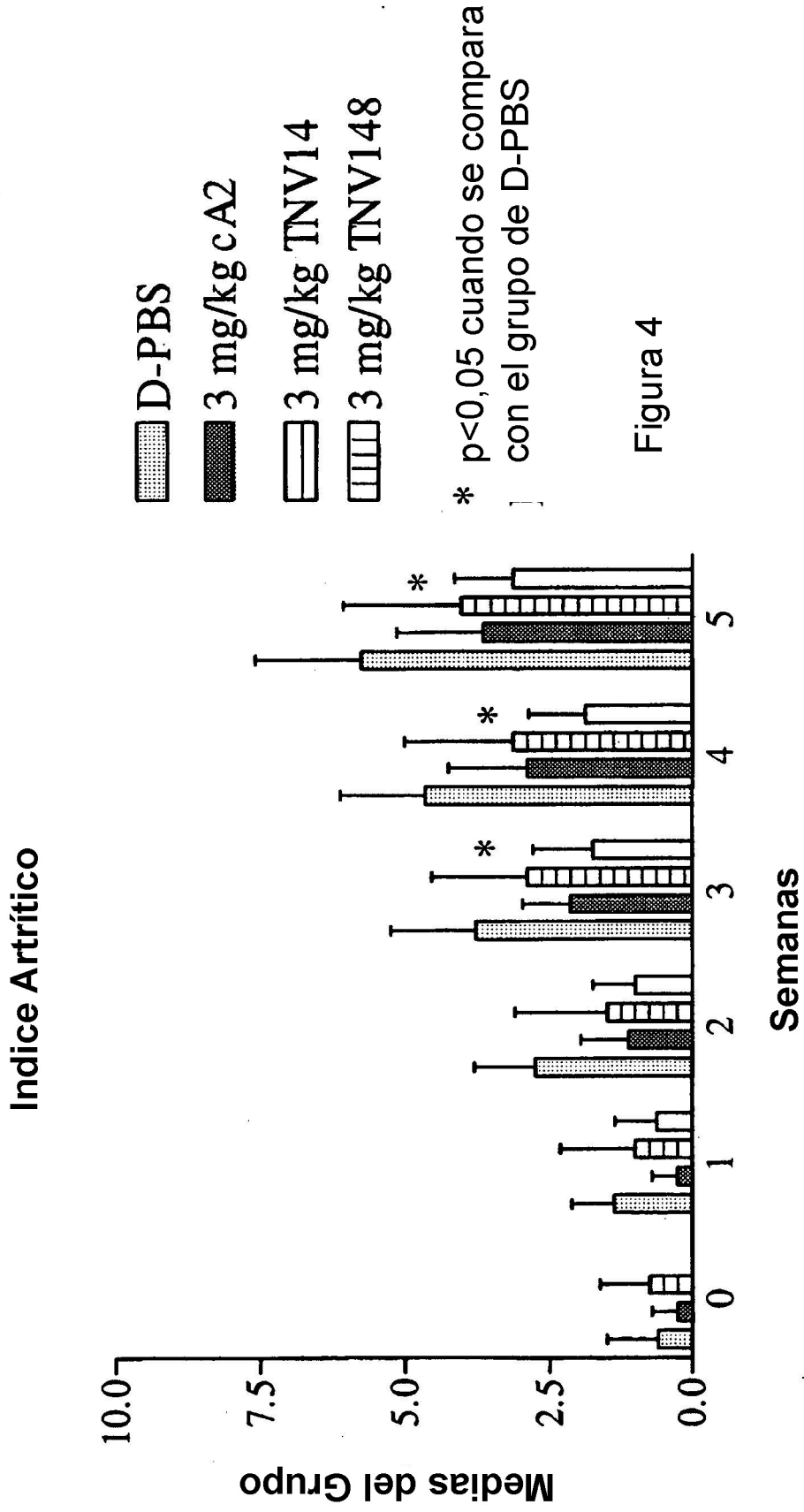


FIGURA 13C

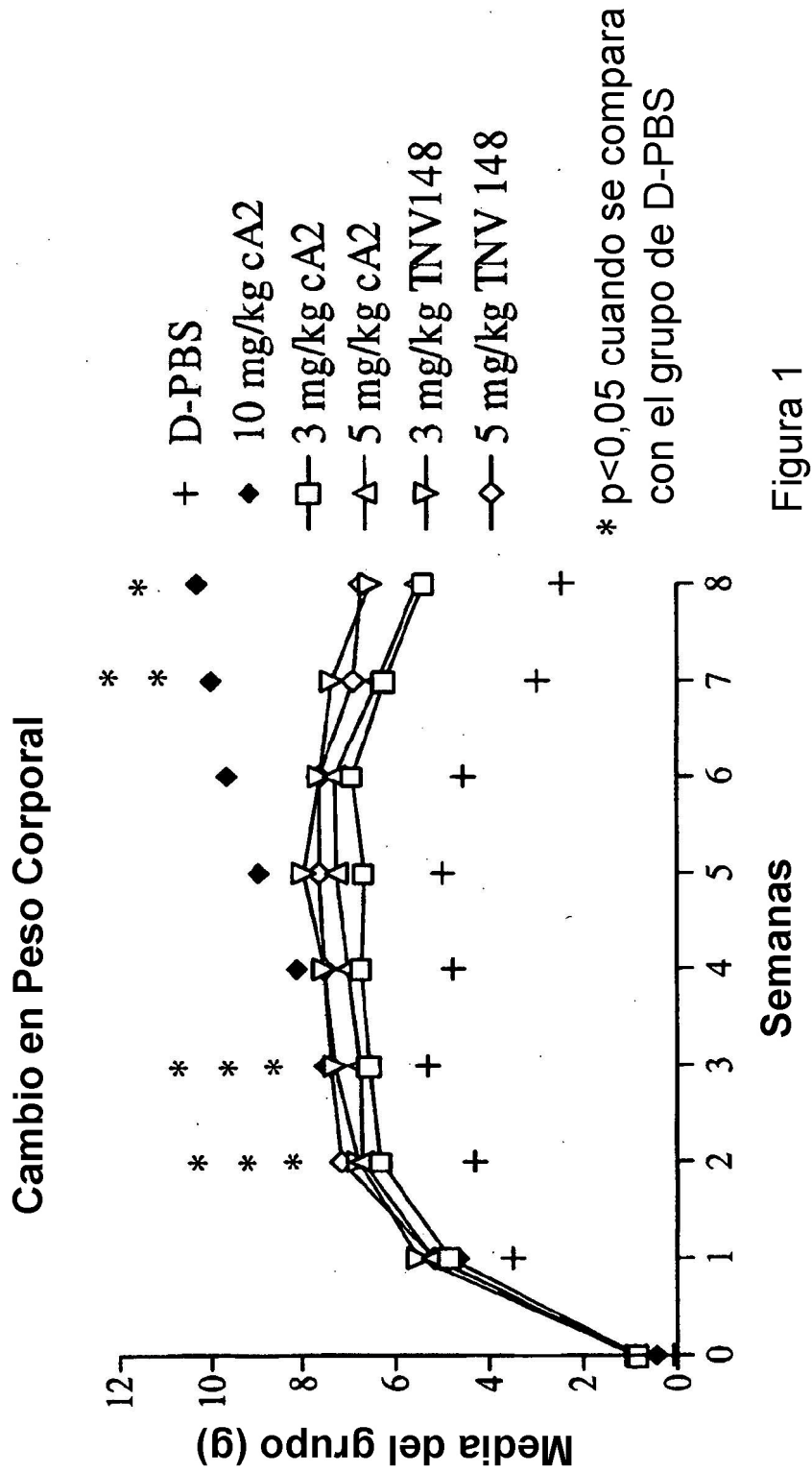


Figura 1

FIGURA 14

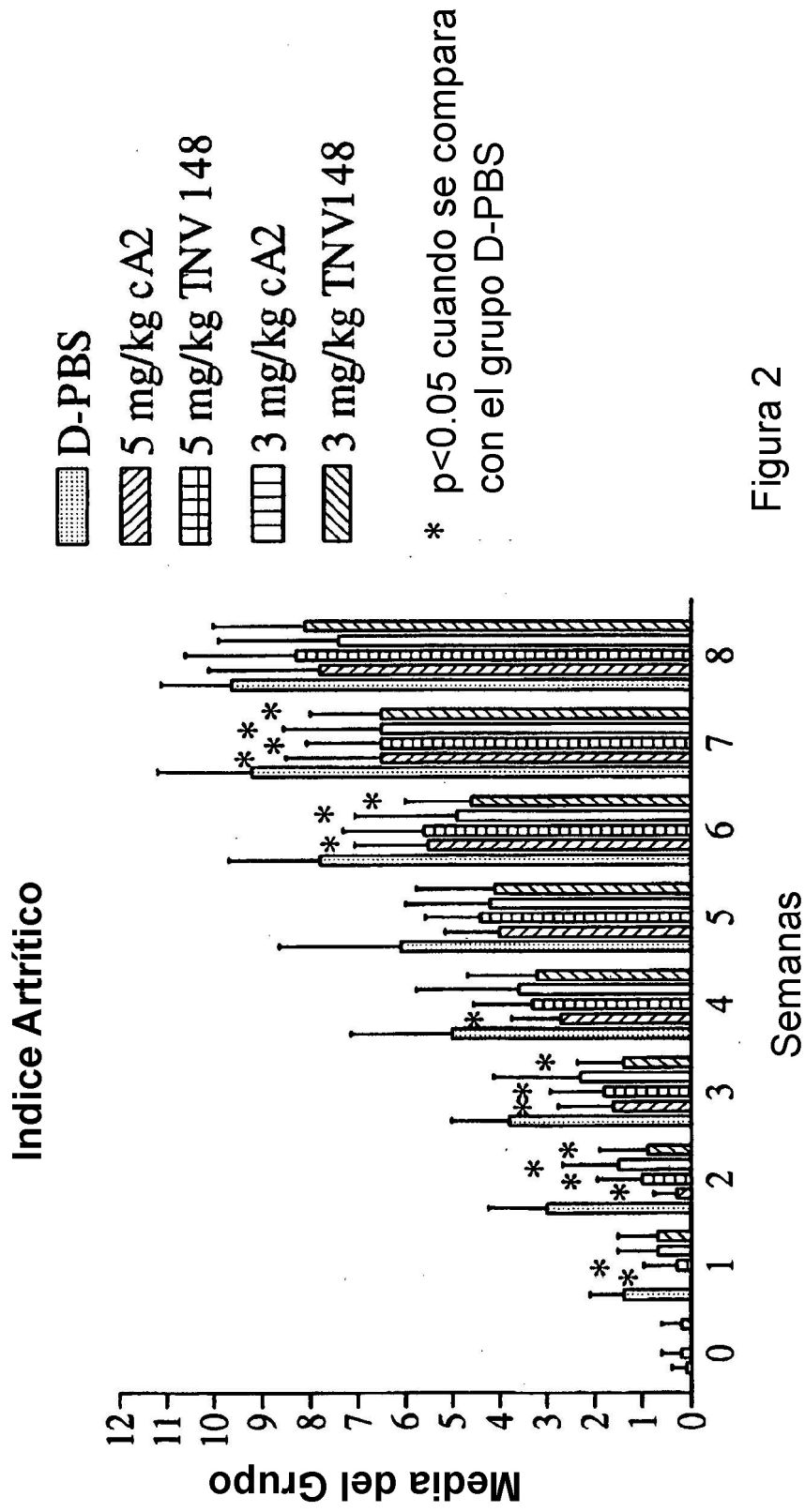


Figura 2

FIGURA 15

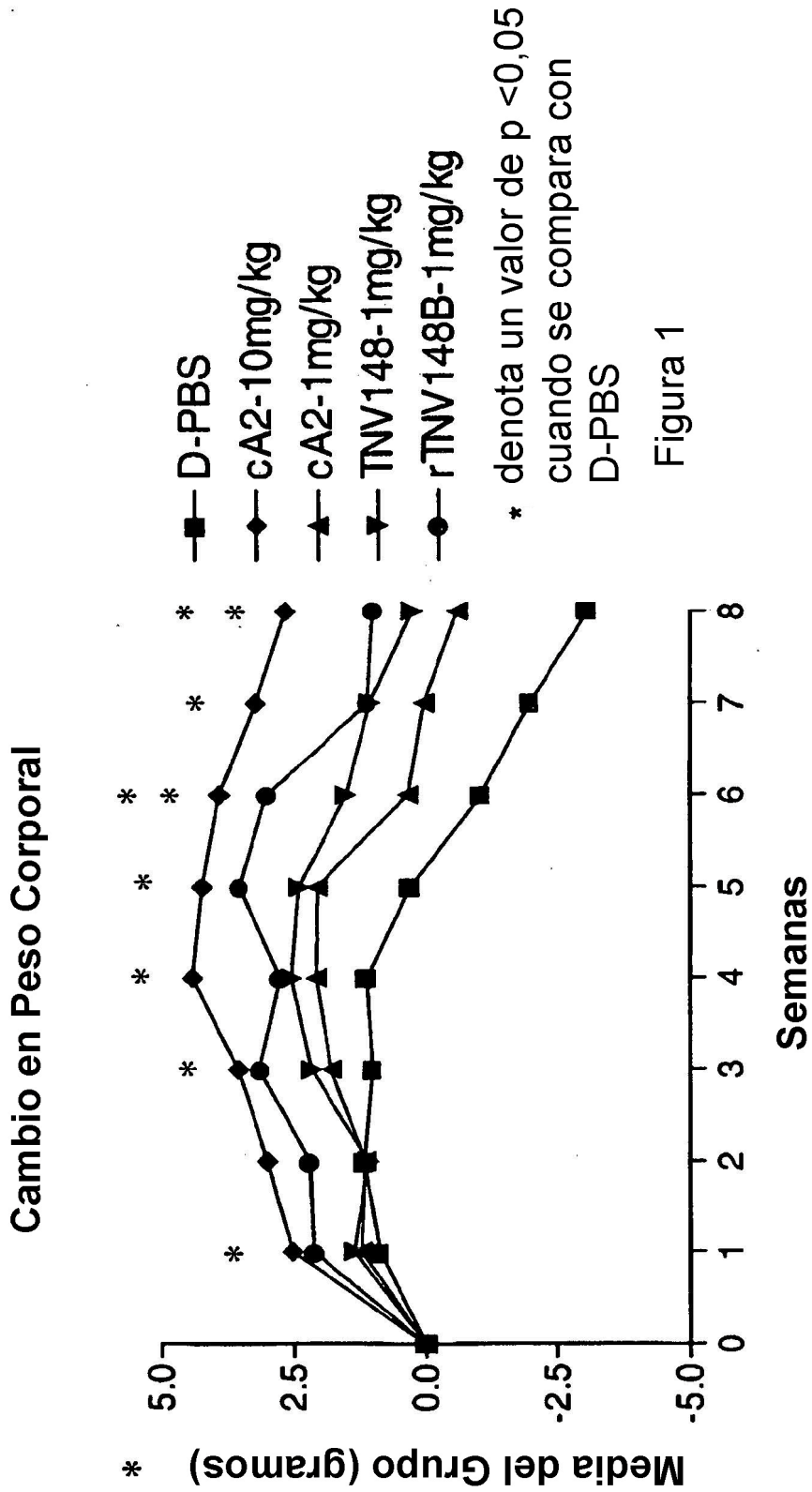


FIGURA 16

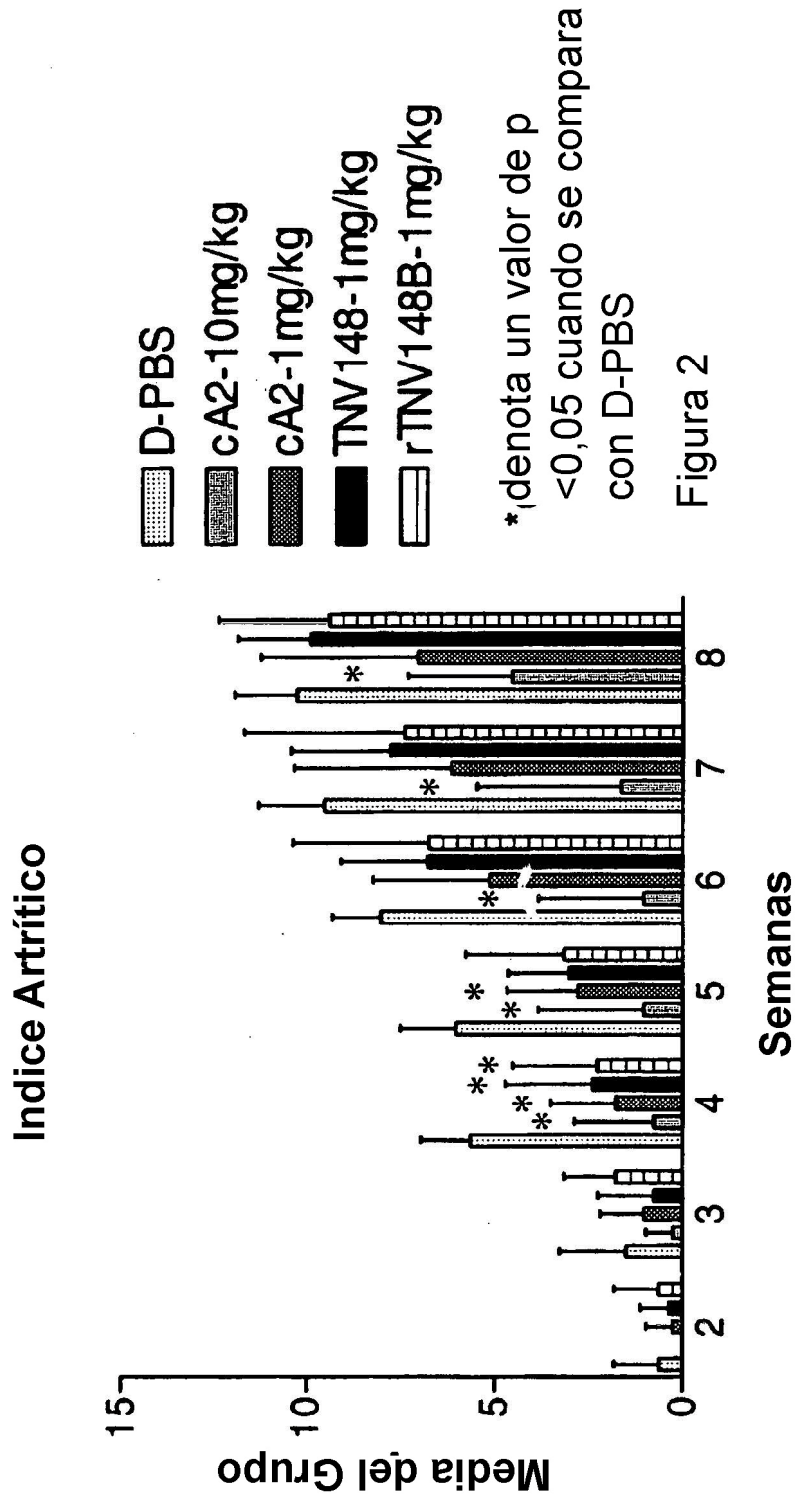


Figura 2

FIGURA 17