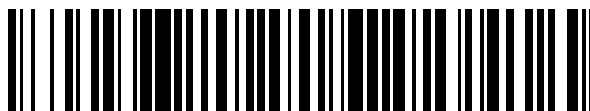


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 285**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013** **PCT/US2013/060480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14047222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013** **E 13773474 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2897978**

54 Título: **Métodos para identificar anticuerpos con inmunogenicidad reducida**

30 Prioridad:

19.09.2012 US 201261703170 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

73 Titular/es:

ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

HARDING, FIONA A. y
RAZO, OLIVIA JENNIFER

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 621 285 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para identificar anticuerpos con inmunogenicidad reducida**5 1. Referencia cruzada a solicitudes relacionadas****2. Lista de secuencias**

10 La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado en formato ASCII a través de EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el 17 de septiembre de 2013, es denominada 381493-721WO(118133)_SL.txt y tiene 6.980 bytes de tamaño.

3. Antecedentes

15 Los epítopos de células B son los sitios de las moléculas que son reconocidos por los anticuerpos del sistema inmunológico. La identificación de epítopos de células B en proteínas terapéuticas puede ser útil en el diseño de variantes que no provocan una respuesta inmunitaria cuando administran a los pacientes.

20 Los epítopos de células B pueden ser identificados mediante la mutación individual de aminoácidos de una proteína, típicamente con alanina (barrido de alanina), y determinando el efecto de cada mutación sobre la unión del anticuerpo (Onda et al., 2011, Proc. Natl. Acad. Sci 108(14):5742-7). Una interrupción de la unión proteína-anticuerpo después de la mutagénesis indica que el residuo mutado es parte de un epítipo de células B reconocido por el anticuerpo. Se ha encontrado que incluso una sola mutación en un epítipo de células B puede eliminar la unión a un panel de anticuerpos dirigidos a la proteína, y que la inmunogenicidad de una proteína puede ser
25 reducida por la introducción de mutaciones en un epítipo de células B (Nagata y Pastan, 2009, Advanced Drug Delivery Reviews 61:977-985). Sin embargo, este enfoque requiere también tiempo y mucho esfuerzo. Por otra parte, el barrido de alanina no necesariamente identifica las mutaciones que proporcionarían la mayor reducción de inmunogenicidad.

30 Por lo tanto, existe una necesidad de un método que no requiera esfuerzo pero integral que permita la identificación y eliminación de epítopos de células B.

4. Compendio

35 La presente descripción proporciona un sistema que permite la contribución inmunogénica de todos y cada uno de los aminoácidos dentro de una zona de interés en un anticuerpo de referencia que debe ser dilucidado. La descripción proporciona que un residuo de aminoácido en cualquier, algunas o todas las posiciones de un anticuerpo de referencia se puede mutar en algunos o todos los otros 19 aminoácidos y evaluar el efecto de esa la mutación sobre la inmunogenicidad del anticuerpo. También se puede evaluar el efecto de las mutaciones sobre el nivel de
40 expresión del anticuerpo y/o la unión a una molécula diana también, lo que permite la identificación de variantes de anticuerpos en las que se eliminan o mitigan regiones inmunogénicas que todavía conservan propiedades ventajosas (p.ej., niveles de expresión adecuados, unión a moléculas diana). En consecuencia, la presente descripción proporciona métodos para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Los métodos se basan en el escrutinio y la identificación de variantes de anticuerpos con reducción de la unión a anticuerpos anti-idiotípicos. La reducción de la unión a anticuerpos anti-idiotípicos se correlaciona con la reducción de la inmunogenicidad in vivo
45 (véase, por ejemplo, Nagata y Pastan, 2009, Advanced Drug Delivery Reviews 61: 977-985).

Los métodos de la descripción comprenden generalmente las etapas de (a) poner en contacto una biblioteca de células anfitrionas con un anticuerpo anti-idiotípico que se une específicamente al anticuerpo de referencia, siendo el
50 anticuerpo de referencia un anticuerpo monoclonal que se une a una molécula diana, comprendiendo la biblioteca de células anfitrionas células anfitrionas de mamífero que expresan cada una sobre superficie de la célula una variante de anticuerpo que difiere del anticuerpo de referencia en una única mutación puntual de aminoácidos; (b) identificar una población de células en dicha biblioteca de células anfitrionas que expresan variantes de anticuerpos que muestran disminución de la unión al anticuerpo anti-idiotípico con respecto al anticuerpo de referencia; y (c)
55 identificar una variante de anticuerpo en la que está enriquecida la población, identificando de este modo una variante de un anticuerpo de referencia con inmunogenicidad reducida. En ciertos aspectos, los métodos implican someter la biblioteca de células anfitrionas a citometría de flujo y clasificación de la población de la biblioteca de células anfitrionas utilizando, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

60 En ciertos aspectos, los métodos comprenden adicionalmente una etapa de determinación de si la variante de anticuerpo que tiene inmunogenicidad reducida se une a la molécula diana a un nivel que es sustancialmente igual o mejor que el del anticuerpo de referencia y/o se expresa a un nivel que es sustancialmente igual a o mejor que el nivel de expresión del anticuerpo de referencia. En realizaciones específicas, la unión y la expresión se determinan mediante citometría de flujo, clasificación mediante esferas magnéticas, BIAcore, FACS, ELISA, AlphaLisa, o

KinExA, y se determinan antes, simultáneamente, o después de la identificación de las variantes de anticuerpos que tienen inmunogenicidad reducida.

Los métodos descritos en la presente memoria se han aplicado al anticuerpo anti-TNF- α D2E7 (también conocido como Adalimumab). Se identificaron variantes de D2E7 con reducción de la unión a uno, dos, o tres anticuerpos anti-idiotípicos diferentes. La presente descripción proporciona anticuerpos anti-TNF- α con secuencias de CDR relacionadas con las de D2E7, pero que tienen al menos una sustitución que reduce la unión a anticuerpos anti-Id. Tales variantes se denominan a veces en la presente memoria como variantes de "inmunogenicidad reducida".

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción comprenden seis CDR que tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a SEQ ID NO:5 (CDR-H1), SEQ ID NO:6 (CDR-H2), SEQ ID NO:7 (CDR-H3), SEQ ID NO:8 (CDR-L1), SEQ ID NO:9 (CDR-L2) y SEQ ID NO:10 (CDR-L3), y tienen al menos una sustitución seleccionada entre G5F en CDR-L1, G5I en CDR-L1, G5V en CDR-L1, G5W en CDR-L1, G5Y en CDR-L1, R7I en CDR-L1, R7T en CDR-L1, R7V en CDR-L1, N8A en CDR-L1, N8D en CDR-L1, N8E en CDR-L1, N8G en CDR-L1, N8L en CDR-L1, N8M en CDR-L1, N8Q en CDR-L1, N8R en CDR-L1, N8T en CDR-L1, A1I en CDR-L2, A1T en CDR-L2, A1V en CDR-L2, T4D en CDR-L2, R2G en CDR-L3, N4F en CDR-L3, N4M en CDR-L3, N4W en CDR-L3, N4Y en CDR-L3, R5L en CDR-L3, R5N en CDR-L3, R5W en CDR-L3, R5Y en CDR-L3, T9Y en CDR-L3, D1S en CDR-H1, Y2A en CDR-H1, Y2C en CDR-H1, Y2K en CDR-H1, Y2M en CDR-H1, Y2R en CDR-H1, Y2S en CDR-H1, Y2V en CDR-H1, H5C en CDR-H1, H5D en CDR-H1, H5E en CDR-H1, H5S en CDR-H1, H5T en CDR-H1, T3A en CDR-H2, T3G en CDR-H2, T3N en CDR-H2, W4A en CDR-H2, W4F en CDR-H2, W4H en CDR-H2, W4L en CDR-H2, W4M en CDR-H2, W4V en CDR-H2, N5G en CDR-H2, S6D en CDR-H2, S6L en CDR-H2, I9K en CDR-H2, D10L en CDR-H2, Y1A en CDR-H2, Y11C en CDR-H2, Y11E en CDR-H2, Y11F en CDR-H2, Y11G en CDR-H2, Y11H en CDR-H2, Y11I en CDR-H2, Y11K en CDR-H2, Y11L en CDR-H2, Y11M en CDR-H2, Y11N en CDR-H2, Y11Q en CDR-H2, Y11R en CDR-H2, Y11S en CDR-H2, Y11V en CDR-H2, Y1IW en CDR-H2, A12Y en CDR-H2, D13N en CDR-H2, V15D en CDR-H2, V15L en CDR-H2, V15M en CDR-H2, V15Q en CDR-H2, V15T en CDR-H2, E16F en CDR-H2, E16H en CDR-H2, E16K en CDR-H2, E16R en CDR-H2, E16T en CDR-H2, E16W en CDR-H2, G17A en CDR-H2, G17C en CDR-H2, G17E en CDR-H2, G17H en CDR-H2, G17I en CDR-H2, G17K en CDR-H2, G17L en CDR-H2, G17M en CDR-H2, G17N en CDR-H2, G17P en CDR-H2, G17Q en CDR-H2, G17R en CDR-H2, G17S en CDR-H2, G17T en CDR-H2, G17Y en CDR-H2, V1G en CDR-H3, V1R en CDR-H3, V1W en CDR-H3, L4T en CDR-H3, L4V en CDR-H3, T6V en CDR-H3, S9K en CDR-H3, S9W en CDR-H3, S9Y en CDR-H3, y D11V en CDR-H3. Las seis CDR en conjunto pueden tener hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5, o hasta 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de CDR de adalimumab. En ciertos aspectos, cada CDR puede tener hasta 4, hasta 3, o hasta 2 sustituciones en comparación con las CDR de adalimumab. En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción tienen una o más combinaciones de sustituciones de aminoácidos en las que la sustitución de la cadena o cadenas pesadas, si están presentes, comprenden al menos una de (a) Y2K en CDR-H1; (b) Y2M en CDR-H1; (c) Y2K en CDR-H1 y T6V en CDR-H3; (d) Y2K en CDR-H1, V1G en CDR-H3 y T6V en CDR-H3; (e) V1W en CDR-H3; y (f) V1G en CDR-H3 y T6V en CDR-H3, y en las que la sustitución o sustituciones de la cadena ligera, si están presentes, comprenden al menos una de (a) G5S en CDR-L1 y A11S en CDR-L1; (b) R7I en CDR-L1; (c) G5S en CDR-L1, R7T en CDR-L1 y A11S en CDR-L1; y (d) G5S en CDR-L1, R7I en CDR-L1 y A11S en CDR-L1. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la descripción comprenden una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre las indicadas en la FIG. 22.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción preferiblemente tienen reducción de la unión a uno, dos, tres, cuatro, cinco o los seis anticuerpos anti-idiotípicos de Adalimumab 5A1, 10F8, 7A11, 1H11, 6A11, y 10B7.

La presente descripción se refiere adicionalmente a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción y a las células anfitrionas que los comprenden.

La presente descripción se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción y a métodos de tratamiento de un paciente humano que padece un trastorno inmunitario mediante la administración de los anticuerpos anti-TNF- α o composiciones farmacéuticas que los contienen. En ciertos aspectos, el trastorno inmunológico tratada es la artritis reumatoide (AR) (incluyendo la AR moderada o grave en los adultos), la artritis idiopática juvenil (AIJ) (incluyendo AIJ poliarticular moderada a severa en pacientes de 4 años de edad y mayores), la artritis psoriásica (APs) (incluyendo APs en adultos), la espondilitis anquilosante (EA) (incluyendo EA en adultos), la enfermedad de Crohn (EC) (incluyendo EC moderada o grave en adultos), psoriasis en placas crónica (Ps) (incluyendo psoriasis en placas crónica moderada a severa en adultos), o espondiloartritis axial (EsAax) (incluyendo EsAax grave en pacientes adultos que no tienen evidencia de rayos X de daño estructural).

5. Breve descripción de las figuras

FIG. 1A-1C: La FIG. 1A proporciona las secuencias de aminoácidos traducidas de los fragmentos pesado variable (V_H) y ligero variable (V_L) de D2E7 sintético (Adalimumab, HUMIRA). La FIG. 1B proporciona las secuencias de aminoácidos de CDR de los fragmentos V_H y V_L de D2E7. La FIG. 1C proporciona las

secuencias de nucleótidos de los fragmentos V_H de D2E7 y V_L de D2E7 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, respectivamente).

FIG. 2: proporciona una lista de mutaciones beneficiosas en V_L de D2E7 que conducen a una unión neutra a TNF- α y una disminución de la unión a anti-Ig 5A1 (a), 10F8 (b), o 7A11 (c). Las posiciones de aminoácidos se proporcionan tanto en el contexto de las CDR individuales como en la numeración de Kabat. La FIG. 2 describe los SEQ ID NO: 8-10, respectivamente, en orden de aparición.

FIG. 3A-3B: La FIG. 3A proporciona una lista de mutaciones beneficiosas en CDR-H1 y CDR-H2 de V_H de D2E7 que dará lugar a una unión neutra a TNF- α y una disminución de la unión a anti-Ig 1H11 (d), 6A11 (e), o 10B7 (f). La FIG. 3B proporciona una lista de mutaciones beneficiosas en CDR-H3 de V_H de D2E7 que dará lugar a una unión neutra a TNF- α y una disminución de la unión a anti-Ig 1H11 (d), 6A11 (e), o 10B7 (f). Las posiciones de aminoácidos se proporcionan tanto en el contexto de las CDR individuales como en la numeración de Kabat. La FIG. 3A describe los SEQ ID NO: 5-6, respectivamente, en orden de aparición. La FIG. 3B describe el SEQ ID NO: 7.

La FIG. 4 proporciona la estructura de D2E7 en vectores de pYA206 y pCW600.

La FIG. 5 proporciona un diagrama de titulación de TNF- α humano con Fab D2E7 WT expresado en la superficie celular.

La FIG. 6 proporciona un diagrama de titulación de anticuerpos anti-idiotipo (anti-id) que se unen a Fab D2E7 WT expresado en la superficie celular.

FIG. 7A-7B: La FIG. 7A proporciona perfiles de clasificación mediante FACS para D2E7 de tipo salvaje teñido con TNF- α . La FIG. 7B proporciona perfiles de clasificación mediante FACS para la biblioteca de mutación puntual de V_H teñida con TNF- α .

Las FIG. 8A-8B proporcionan perfiles de clasificación mediante FACS para D2E7 de tipo salvaje y la biblioteca de mutación puntual de V_H teñida con 1H11.

La FIG. 9 proporciona razones de enriquecimiento de D2E7 en mutación de codón silencioso por posición. Las posiciones de aminoácidos se proporcionan en el contexto de las CDR individuales.

La FIG. 10 proporciona un mapa de placa de sub-bibliotecas de D2E7. Las posiciones de aminoácidos se proporcionan tanto en el contexto de las CDR individuales como en la numeración de Kabat. La FIG. 10 describe los SEQ ID NO: 8-10 y 5-7, de arriba a abajo, de izquierda a derecha, respectivamente, en orden de aparición.

La FIG. 11 proporciona perfiles de FACS de sub-bibliotecas de mutantes de D2E7 y controles de tipo salvaje.

La FIG. 12 proporciona perfiles de FACS de sub-bibliotecas de mutantes de D2E7 y controles de tipo salvaje.

Las FIG. 13A-13D proporcionan un modelo de relleno de espacio de D2E7 de la región variable de la cadena pesada. Los paneles A, B, y C muestran las CDR 1, 2, y 3 de la cadena ligera en color gris, respectivamente. El panel D muestra el epítipo de anticuerpos anti-Ig 1H11 en color gris. La secuencia de V_H (SEQ ID NO: 2) según se representa a continuación muestra las CDR subrayadas y las posiciones que son importantes para la unión a anti-Ig 1H11 en texto en negrita con doble subrayado. Cada una de las tres CDR contribuye con uno o más aminoácidos al epítipo.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD**DYAMH**WVRQAPGKGLEWV
 SAI**TWNS**GHIDYADSV**EG**RFTISRDN**AKNS**LYLQ**MNS**LRAEDTAVYYCA
KVSYLSTASSLDYWGQGT**LV**TVSS (SEQ ID NO:2)

Las FIG. 14A-14D proporcionan un modelo de relleno de espacio de la región variable de cadena ligera de D2E7. Los paneles A, B, y C muestran las CDR 1, 2, y 3 de la cadena ligera en color gris, respectivamente. El panel D muestra el epítipo de anticuerpos anti-Ig 5A1 y 10F8 en color gris. La secuencia de V_L (SEQ ID NO: 4) según se representa a continuación muestra las CDR subrayadas y las posiciones que son importantes para la unión a anti-Ig 5A1 y 10F8 en texto en negrita con doble subrayado. Cada una de las tres CDR contribuye con uno o más aminoácidos al epítipo.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQG
 TKVEIK (SEQ ID NO:4)

La FIG. 15 proporciona análisis FACS de un punto de mutantes de CDR1-2 de V_H de D2E7.

5 La FIG. 16 proporciona un análisis posicional representativo de D2E7.

La FIG. 17 proporciona Razones de Enriquecimiento medias de 1H11 por posición.

10 La FIG. 18 proporciona Razones de enriquecimiento medias de 5A1 por posición.

La FIG. 19 proporciona Razones de enriquecimiento medias de 10F8 por posición.

15 Las FIG. 20A-20B muestran el impacto de las mutaciones de anticuerpos anti-TNF- α sobre la unión a anticuerpos anti-Adalimumab en muestras de suero de cuatro donantes comerciales. Las posiciones de aminoácidos se proporcionan en la numeración de Kabat. VL-SS se refiere a una VL que tiene las sustituciones G28S y A34S en CDR-L1 (numeración de Kabat), correspondiente a la combinación G5S + A11S en CDR-L1.

20 Las FIG. 21A-21B muestran anticuerpos variantes anti-TNF- α con las mayores reducciones en la unión a anticuerpos anti-Adalimumab. VL-SS se refiere a una VL que tiene las sustituciones G28S y A34S en CDR-L1 (numeración de Kabat), correspondiente a la combinación G5S + A11S en CDR-L1.

25 La FIG. 22 muestra los datos de unión para las variantes con múltiples sustituciones de aminoácidos. VL-SS se refiere a una VL que tiene las sustituciones G28S y A34S en CDR-L1 (numeración de Kabat), correspondiente a la combinación G5S + A11S en CDR-L1.

6. Descripción detallada

30 6.1. Métodos para identificar anticuerpos con inmunogenicidad reducida

La presente descripción proporciona adicionalmente un sistema que permite la contribución inmunogénica de todos y cada uno de los aminoácidos en una región de interés dentro de un anticuerpo de interés (el anticuerpo de referencia) que se debe dilucidar. Los métodos implican someter el anticuerpo de referencia a una mutagénesis integral en una o más regiones (por ejemplo, una o más de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4), y evaluar el efecto de las mutaciones sobre la unión a un anticuerpo anti-idiotípico (un "anti-Id"). Los métodos descritos en la presente memoria dieron como resultado la identificación de los anticuerpos anti-TNF- α variantes con inmunogenicidad reducida descritas anteriormente.

40 Diseño y construcción de la biblioteca: Se diseña una biblioteca de anticuerpos que contiene cada posible única sustitución de aminoácidos en cada posición posible en una región deseada o dominio de un anticuerpo de referencia para identificar el efecto (bueno, malo o neutro) de una mutación sobre la unión a un anticuerpo anti-Id. A continuación se construye una biblioteca de variantes de anticuerpos, por ejemplo utilizando "codones NNK aleatorios" para generar las variantes de un solo aminoácido, en donde "N" se refiere a cualquier base (p. ej., A, C, G o T) y "K" se refiere a G o T. El esquema de aleatorización NNK puede codificar 32 codones diferentes que cubren
 45 los 20 aminoácidos de origen natural. Los residuos de aminoácidos en cada posición del anticuerpo pueden mutarse a cualquiera de los 19 aminoácidos que son diferentes del aminoácido de tipo salvaje en la misma posición, lo que da como resultado una mutación puntual de un solo aminoácido en el anticuerpo. El resultado final es una biblioteca de variantes de anticuerpos que comprende grupos de múltiples anticuerpos que tienen un residuo que varía de un miembro a otro en la biblioteca. La complejidad general de la biblioteca puede ser de entre aproximadamente 50-
 50 10.000 miembros (p.ej., 50, 100, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, o 10.000 miembros), entre aproximadamente 1000-5000 miembros, o aproximadamente 1000 miembros, basándose en el número de aminoácidos específicos para la mutación. Independientemente del tamaño y la complejidad de la biblioteca, los métodos descritos en la presente memoria permiten la detección simultánea y la secuenciación simultánea de todos los miembros de la biblioteca.

55 Como un ejemplo no limitante, para identificar variantes de anticuerpos específicos con disminución de la inmunogenicidad en comparación con el anticuerpo de referencia, los residuos de aminoácidos en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son objetivos potenciales para la mutación. La eliminación o la mitigación de un epítipo de células B pueden producir un anticuerpo con inmunogenicidad reducida. Típicamente,
 60 se pueden considerar e identificar aproximadamente 50 a 60 posiciones de aminoácidos de las CDR para la

mutación. Se puede diseñar y construir un conjunto de fragmentos de ADN sintéticos, que codifican V_H o V_L parental de tipo salvaje y todas las variantes de anticuerpo de un solo aminoácido posibles. Los codones NNK aleatorios descritos anteriormente se pueden utilizar para generar las variantes de anticuerpo de un solo aminoácido. Por lo tanto, se pueden mutar los residuos de aminoácidos en cada posición dentro de la CDR, dando como resultado mutaciones puntuales de aminoácidos individuales a lo largo de la región CDR seleccionada. El resultado final consiste en bibliotecas de variantes de anticuerpos que son grupos de múltiples anticuerpos que tienen un residuo que varía de un miembro a otro en la biblioteca. En este ejemplo, la biblioteca tiene aproximadamente 1000-1300 miembros, donde cada uno de las 50 a 60 o 65 posiciones de aminoácidos en las CDR en la región seleccionada está sustituido con uno de los 19 aminoácidos de origen natural para un total de 20 aminoácidos diferentes en cualquier posición dada (es decir, $50 \times 20 = 1000$; $60 \times 20 = 1200$, o $65 \times 20 = 1300$).

Expresión de variantes de anticuerpos:

Después de la construcción de la biblioteca, la segunda etapa es expresar la biblioteca de variantes de anticuerpos para la clasificación mediante presentación en la superficie celular. La biblioteca de variantes se puede expresar utilizando los métodos basados en la presentación tales como, por ejemplo, presentación en fagos, presentación en levadura, presentación en bacterias, y presentación en ribosomas, y se expresan preferiblemente en células de mamífero para asegurar el plegamiento apropiado y la modificación post-traducciona de las variantes expresadas.

Para la expresión de mamíferos, los dominios transmembrana utilizados para andar y presentar las moléculas de inmunoglobulina tetraméricas sobre la superficie celular puede ser cualquier dominio transmembrana susceptible de eliminación a través de escisión enzimática, química o fotolítica. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana está flanqueado por sitios de escisión que son reconocidos y escindidos por una enzima de escisión. Por ejemplo, la enzima de escisión puede ser una lipasa, una esterasa, una fosfatasa, una glicosidasa, o una carboxipeptidasa. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende un análogo de oligonucleótido o un oligonucleótido que tiene una secuencia que es reconocida y escindida por una nucleasa tal como una ribonucleasa (ARNasa) o una desoxirribonucleasa (ADNasa). En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende un péptido o análogo de péptido que es reconocido y escindido por una proteasa.

En algunas realizaciones, se puede utilizar ARNm de corte y empalme para producir inmunoglobulinas con o sin el dominio transmembrana (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.947.495).

En otras realizaciones, el dominio de transmembrana está flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa que son reconocidos por una recombinasa. Los ejemplos de los sitios de reconocimiento de recombinasa incluyen, pero no se limitan a, sitios *lox*, sitios *att*, sitios *dif* y sitios *frt*. Para revisiones de recombinasas, véanse, p.ej., Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotech. 5:521-527; Landy, 1993, Curr. Opin. Biotech. 3:699-707; Sadowski, 1993, FASEB 7:760-767; y la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20040115814.

Los dominios transmembrana para su uso en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden derivar de proteínas de membrana tipo I, tipo II y tipo III (véanse, p.ej., Chesnut et al., 1996, J. Imm. Methods, 193:17-27; Wahlberg et al., 1997, J. Cell Biol., 137:555-562; Liao, 2001, Biotech. and Bioeng., 73:313-323; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.264.357 y 6.686.168). Los dominios transmembrana descritos en la presente memoria se pueden utilizar para producir proteínas de fusión del dominio transmembrana de inmunoglobulina que comprenden anticuerpos completos (p.ej., IgG) o fragmentos de los mismos que se anclan y se muestran en la superficie de las células que expresan las proteínas de fusión.

Los dominios transmembrana que son particularmente útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, un dominio de transmembrana del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) (véase, p.ej., Chesnut et al., 1996, J. Imm. Methods, 193:17-27), un dominio transmembrana de B7-1 (véase, por ejemplo, Chou et al., 1999, Biotech. and Bioeng., 65(2):160-169), y un dominio transmembrana del receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) (véase, p.ej., Liao, 2001, Biotech. and Bioeng., 73:313-323). En algunas realizaciones, el dominio de anclaje de superficie celular se refiere a una secuencia señal de GPI que dirige el anclaje de la inmunoglobulina a la superficie celular a través de un conector de glicosidilfosfatidilinositol (GPI) (véanse, p.ej., Medof et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2007-2011; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.109.133 y 5.264.357). En ciertos casos, la secuencia señal de GPI es del factor humano acelerador de la degradación (DAF). En otras realizaciones, el ancla del dominio transmembrana de la superficie celular es de una proteína de inmunoglobulina.

Los vectores de presentación de mamíferos se pueden utilizar para presentar anticuerpos intactos, aunque también se pueden presentar fragmentos de anticuerpo tales como, por ejemplo, Fc, Fab', F(ab')₂, y Fv de cadena sencilla. Las cadenas pesadas y ligeras pueden ser codificadas como un único transcrito en virtud de la utilización de un elemento del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que une la secuencia de polinucleótido que codifica las cadenas ligeras variables y constantes al polinucleótido que codifica las cadenas pesadas variables y constantes.

En una realización, los vectores de presentación de mamífero comprenden un anda de GPI extraíble fusionada al extremo C-terminal de la región constante de cadena pesada para facilitar el aislamiento de anticuerpos con características de unión y actividades biológicas deseadas. Cuando está presente, el anda de GPI permite que moléculas de inmunoglobulina sean presentadas sobre la superficie de la célula anfitriona de mamífero. La eliminación del ancla de GPI mediante digestión con las endonucleasas de restricción apropiadas permite la conversión de las moléculas de inmunoglobulina unidas a la membrana en moléculas solubles.

Los ejemplos de células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células HeLa (células HeLa S3, ATCC CCL2.2), células Jurkat, células Raji, células Daudi, células de riñón embrionario humano (293-HEK; ATCC 293c18, ATCC CRL 1573), células de riñón de mono verde africano (CV-1; Vera; ATCC CRL 1587), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650), células de riñón canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de riñón de cría de hámster (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., 1986, Som Cell Molec Genet, 12, 555)), y otras líneas celulares de roedores, tales como NSO, SP2/O, GHL (ATCC CCL82), H-4-II-E (ATCC CRL 1548), y NIH-3T3 (ATCC CRL 1658).

En una realización, se pueden utilizar los métodos y vectores descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.947.495. El sistema de presentación en superficie celular de mamífero incluye vectores auto-replicantes y células de mamíferos. Los vectores de mamífero autorreplicantes comprenden típicamente: (1) un origen de replicación auto-replicante; (2) al menos un promotor eucariótico; (3) un dominio de transmembrana fijo o retirable; (4) una región constante de cadena ligera; (5) una región constante de cadena pesada; (6) sitios de restricción para la inserción de regiones variables de cadena ligera y pesada; (7) un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES); y (8) al menos un marcador seleccionable. Además, los vectores pueden comprender un origen de replicación procariótico, un terminador de la transcripción, una señal de poliadenilación y/o secuencias líder, así como otras secuencias necesarias para la expresión en células anfitrionas eucariotas. Una vez transformadas, las células anfitrionas se incuban en condiciones que permiten la expresión de los anticuerpos. Los plásmidos resultantes se pueden recuperar fácilmente a partir de células como se ha descrito (véase, p.ej., Hirt, 1967, J. Mol. Biol., 26, 365-369).

Además de las técnicas anteriores, se puede emplear una biblioteca de presentación en la superficie de levaduras para la presentación en la superficie celular de bibliotecas de anticuerpos variantes. La tecnología de presentación en la superficie de levaduras (revisada por Boder y Wittrup, 2000, Methods in Enzymology 328:430-444) permite que se expresen bibliotecas de anticuerpos en la pared celular de levaduras en una forma accesible para interactuar con una molécula marcada para el análisis en los métodos de clasificación de células. En una realización, las variantes se expresan como proteínas de fusión con toda o una porción de la proteína AGA2 de levadura, que se llega a presentar en la superficie de la pared celular de levaduras, para la clasificación de acuerdo con los métodos descritos a continuación. Véanse, p.ej., Boder et al., 1997, Nat. Biotechnol. 15:553-557 y Feldhaus et al., 2003, Nat. Biotechnol. 21:163-170.

También se puede utilizar la presentación en fagos de variantes de anticuerpos. Las cadenas de anticuerpos se pueden expresar como proteínas de fusión con una proteína de la cubierta del fago de la superficie exterior del fago. Después de eso, los paquetes de presentación se pueden seleccionar para la presentación de anticuerpos que se unen a una diana. En una realización, las variantes de anticuerpos se muestran en una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula y se expresan en el exterior del fago. Los métodos de presentación en fagos de anticuerpos son conocidos por los expertos en la técnica y son descritos, por ejemplo, por Hoogenboom, en "Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications", de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, N.J.).

En otra realización, la tecnología de presentación en ribosomas (véanse Hanes et al., 2000, Meth. Enzymol. 328:403-430; Pluckthun et al., 2000, Adv. Prot. Chem. 55:367-403; Lipovsek y Pluckthun, 2004, J. Immunological Methods 290:51-67) se utiliza para expresar anticuerpos variantes. La tecnología de presentación en ribosomas incorpora la traducción *in vitro* y enlace covalente o no covalente entre genotipo, tal como ARN, y el fenotipo codificado, tal como un anticuerpo variante, para seleccionar anticuerpos variantes que tienen una reducción de la unión a anticuerpos anti-Id. La biblioteca se elabora mediante la síntesis de una reserva de ADN de diversas secuencias que a continuación se transcriben para producir una reserva de ARNm. La traducción *in vitro* se utiliza para generar los polipéptidos o proteínas codificados mostrados, y las interacciones de unión deseables se seleccionan utilizando un compañero de unión inmovilizado. El ARNm que codifica las entidades de unión puede ser utilizado para preparar ADNc, que a continuación puede ser amplificado y el procedimiento puede repetirse para enriquecer la población de genes que codifican anticuerpos variantes con características deseadas. Las proteínas seleccionadas pueden ser identificadas mediante clonación de las secuencias codificantes individuales y secuenciación de ADN.

También se puede utilizar un sistema de presentación en bacterias para expresar anticuerpos variantes. Véase, por

ejemplo, Skerra et al., 1988, Science 240:1038-1041; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043; Harvey et al., 2004, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(25):9193-9198; y Mazor et al., 2007, Nat. Biotechnol. 25(5):563-565.

Clasificación de Bibliotecas:

Las células anfitrionas que presentan variantes de anticuerpos expresadas se pueden clasificar utilizando análisis de enriquecimiento por afinidad. Los anticuerpos variantes se pueden clasificar en función de su (1) pérdida de unión a un anti-Id, (2) opcionalmente, retención de la unión al antígeno diana y (3) opcionalmente, nivel de expresión. Los anti-ID son anticuerpos dirigidos contra las regiones variables de otros anticuerpos. Por esta razón, el sitio de unión al antígeno de un anti-Id puede ser similar a la molécula diana a la que se une el anticuerpo reconocido por el anti-Id. Los métodos de fabricación de anti-ID son conocidos en la técnica, y en general implican el uso del anticuerpo de interés (p.ej., el anticuerpo de referencia) como inmunógeno para generar anticuerpos por medios tradicionales, tales como los descritos a continuación para el anticuerpo de referencia. Los anticuerpos anti-id puede ser monoclonales de origen humano o animal.

Los ejemplos de los análisis adecuados para su uso en la clasificación de las variantes de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación mediante esferas magnéticas, tecnología de detección de anticuerpos CellSpot™ de Trellis Bioscience, Inc. (South San Francisco, CA), y/o el aparato de escrutinio de clones de células de mamíferos ClonePix FL de Genetix Ltd. (Hampshire, Reino Unido).

Para la clasificación FACS, las células se incuban con un anticuerpo marcado fluorescentemente (p.ej., un anti-Id o un anticuerpo que detecta un epítipo común en las porciones no mutagenizadas de las variantes) o antígeno diana a una concentración próxima a la constante disociación (K_D) para determinar la afinidad del anticuerpo de referencia, para determinar la discriminación máxima entre el anticuerpo de referencia y las variantes con afinidades similares. Las células teñidas se clasifican en una o más subpoblaciones de tal manera que se aumentan o disminuyen las frecuencias de las variantes con una propiedad de interés en la subpoblación relevante.

La clasificación para determinar la unión anti-Id se puede realizar utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Generalmente, las células que expresan variantes de anticuerpos se incuban con un anti-Id y se clasifican por la cantidad de anti-Id unido. Se puede obtener un valor de unión de referencia a partir de células que expresan el anticuerpo de referencia, y se pueden identificar las células que muestran disminución de la unión a los anticuerpos anti-Id clasificando las células en subpoblaciones que tienen anti-Id unido por encima o por debajo del valor de referencia.

Opcionalmente, las variantes de anticuerpos de expresión en células también se clasifican basándose en los niveles de expresión. La cantidad total de anticuerpo fluorescente o antígeno unido a una célula que expresa una variante de anticuerpo durante, p.ej., FACS, se relaciona tanto con la afinidad de unión como con la cantidad total de anticuerpo variante presentado. La cantidad de anticuerpo variante presentado puede variar de clon a clon. Por lo tanto, en ciertos casos, las células que expresan los anticuerpos variantes de interés, por ejemplo, una IgG completa anclada a la superficie celular a través de un ancla de dominio transmembrana, pueden ordenarse utilizando FACS utilizando un anticuerpo marcado fluorescentemente contra la inmunoglobulina (p.ej., anticuerpo anti-IgG) (además de la clasificación para la unión anti-Id). Los diferentes anticuerpos utilizados para la detección de diferentes propiedades, por ejemplo, el anti-Id y el anticuerpo anti-IgG utilizado para detectar los niveles de expresión, típicamente se marcan con fluoróforos que tienen diferentes espectros de excitación y/o de emisión, proporcionando de este modo un sistema de detección de dos colores.

Las células también se pueden clasificar para determinar la unión a la diana. Típicamente, será deseable seleccionar una variante de anticuerpo que conserve la unión a la diana, p.ej., una variante con aproximadamente igual o mayor unión a la molécula diana en comparación con el anticuerpo de referencia. Las bibliotecas teñidas simultáneamente con anti-Id y molécula diana se pueden clasificar mediante FACS en dos subpoblaciones: una primera población por encima de un cierto umbral para la unión a la diana, y una segunda población doblemente clasificada para unión a la diana, así como para la disminución de la unión anti-idiotipo. Las diferentes moléculas utilizadas para la detección de diferentes propiedades, p.ej., el anti-Id y la molécula diana, se marcan típicamente con fluoróforos que tienen diferentes espectros de excitación y/o de emisión, proporcionando de este modo un sistema de detección de dos colores.

En otras realizaciones, las células pueden ser clasificadas para determinar la unión anti-Id, los niveles de expresión y unión a la diana. En estas realizaciones, se puede utilizar un sistema de detección de tres colores utilizando tres etiquetas distinguibles.

Cuando se utiliza tinción doble o triple para la clasificación simultánea de la unión anti-Id y los niveles de expresión y/o unión a la diana, la diana marcada y anticuerpos marcados se marcan típicamente con fluoróforos que tienen diferentes espectros de excitación y/o de emisión, proporcionando así un sistema de detección de dos colores o de tres colores. La clasificación en diferentes poblaciones también se puede llevar a cabo en serie. Por ejemplo, las

células clasificadas en una subpoblación que tiene reducción de la unión al anti-Id se pueden clasificar en más subpoblaciones basándose en la unión a la diana y los niveles de expresión, produciéndose la clasificación basada en la unión a la diana y en niveles de expresión simultáneamente o sucesivamente. En otras realizaciones, las variantes identificadas durante la clasificación para determinar la unión de anticuerpos anti-idiotípicos (y las células anfitrionas que los expresan) se caracterizan para determinar la unión a la diana utilizando un métodos de validación independientes descritos más abajo.

Análisis de las poblaciones clasificadas:

Después de la clasificación en subpoblaciones, la frecuencia de cada variante de anticuerpo en cada subpoblación se puede determinar mediante la secuenciación de los plásmidos que codifican las variantes. Un método de secuenciación de ADN preferido de la descripción es la "secuenciación masiva en paralelo" o la "pirosecuenciación masiva en paralelo" (véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.787.308; 6.833.246; 6.897.023; 6.956.114; 7.057.026; 7.115.400, 7.211.390; y 7.232.656). Este método permite la secuenciación rápida y económica de ADN y acelera la identificación de variantes de anticuerpos específicos con la actividad o características deseadas.

Después de la secuenciación, se puede realizar el análisis estadístico de las secuencias para identificar las variantes deseadas. Tal análisis puede incluir el análisis mediante ordenador de las secuencias de ADN de partida. Las secuencias de ADN de partida se pueden traducir a secuencias de proteína, alinear y comparar con el anticuerpo de referencia para identificar las mutaciones. La frecuencia de cada aminoácido observado en cada posición puede ser tabulada para determinar el tipo de categoría (p.ej., disminución de la inmunogenicidad y aumento, disminución, o expresión neutra o afinidad por la molécula diana) y se comparó con el anticuerpo de referencia. La población seleccionada presentará un enriquecimiento de las variantes con la actividad deseada, tales como, p.ej., aquellas que reducen la inmunogenicidad, conservan la expresión, y/o conservan la unión a la molécula diana, mientras que la población seleccionada presentará un empobrecimiento de las variantes con actividades no deseadas.

Se puede calcular una razón de enriquecimiento (RE) para cada variante que proporciona una medida del grado de enriquecimiento o empobrecimiento de la variante en una población en comparación con otras variantes y/o el anticuerpo de referencia. En realizaciones en las que las células se clasifican en función de (a) los niveles de expresión por encima de un cierto umbral y (b) una baja unión a un anticuerpo anti-idiotipo (la población "clasificada"), el número de veces que una mutación se encuentra en una posición dada es normalizado para determinar el número de veces que se secuenció esa posición y se expresa como una frecuencia por 1000 secuencias. A continuación, la frecuencia de la mutación en la población clasificada se divide por la frecuencia en la población expresada para proporcionar la Razón de Enriquecimiento (RE) que indica si la población clasificada ha resultado enriquecida o empobrecida en la mutación en comparación con la población expresada, y en qué grado. Las mutaciones en las que ha resultado enriquecida la población clasificada presentarán una disminución de la unión al anti-idiotipo, mientras que las mutaciones en las que ha resultado empobrecida presentarán un aumento de unión al anti-idiotipo. Del mismo modo, los coeficientes de enriquecimiento pueden ser calculados para cada variante clasificada de acuerdo con el aumento de afinidad, la disminución de afinidad o similar afinidad (neutra) por la diana.

En realizaciones en las que las células se clasifican sólo para determinar la disminución de la unión al anti-idiotipo, p.ej., cuando las células se clasifican de forma no simultánea para determinar los niveles de expresión, se puede determinar una razón de enriquecimiento dividiendo la frecuencia de la mutación en una subpoblación en la que se ha unido el anti-idiotipo por debajo de un valor de referencia determinado a partir de células que expresan el anticuerpo de referencia por la frecuencia de la mutación en una subpoblación en la que se ha unido el anti-idiotipo a un valor igual al valor de referencia o superior.

Validación de las variantes individuales:

Las características de unión de los polipéptidos variantes expresados individualmente pueden analizarse utilizando una variedad de técnicas para confirmar su comportamiento en el contexto de una biblioteca. Estas técnicas incluyen BIAcore, FACS, ELISA, AlphaLisa y KinExA. Los análisis BIAcore determinan la unión utilizando resonancia de plasmón superficial (RPS), un fenómeno óptico que permite la detección de interactuantes sin marcar y se pueden utilizar para determinar la afinidad de unión de variantes de anticuerpos individuales (p.ej., Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2008/0274114; y Che et al., 2009, J. Pharm. y Biomed. Analysis 50(2):183-188). AlphaLIS A se puede utilizar para determinar la afinidad de unión de variantes individuales a una molécula diana (véase, *por ejemplo*, Ullman et al., 1996, Clinical Chemistry, 42(9):1518-1526; y Hideharu et al., 2007, Cancer Science 98(8):1275-80). KinExA (análisis de exclusión cinética) mide la concentración de la molécula de receptor (R) no complejo en una mezcla de receptor, ligando (L), y complejo LR. La concentración de R no complejo se mide mediante la exposición de la mezcla en fase de solución a L inmovilizado en fase sólida durante un período de tiempo muy breve. El "tiempo de contacto" entre la mezcla en fase de solución y L inmovilizado en fase sólida se mantiene lo suficientemente breve para que la disociación del complejo de LR sea insignificante. Cuando se excluye cinéticamente la posibilidad de disociación significativa del complejo LR, solamente puede unirse a la fase sólida R

no complejo ("libre"). La cantidad de R libre que se une a la fase sólida (medida por la emisión de fluorescencia de un marcador secundario) es directamente proporcional a la concentración de R libre en la muestra en fase de solución. KinExA también se puede utilizar para determinar la afinidad de unión de variantes individuales a una molécula diana (*véanse, por ejemplo*, la Solicitud de Patente de Estados Unidos. Núm. 2008/0274114; y Darling et al., 2004, ASSAY and Drug Development Technologies 2:647-657).

6.2. Anticuerpos anti-TNF- α variantes

Los métodos descritos anteriormente se han aplicado al anticuerpo anti-TNF- α D2E7, también conocido como adalimumab, para identificar variantes con una afinidad reducida por un anticuerpo anti-idiotípico en comparación con D2E7. Las variantes que muestran afinidad reducida por los anticuerpos anti-idiotípicos se conocen como variantes de "inmunogenicidad reducida".

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-TNF- α que tienen una inmunogenicidad reducida en comparación con D2E7. Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción tienen típicamente una o más sustituciones de aminoácidos en sus CDR en comparación con las CDR de D2E7, en donde dichas al menos una o más sustituciones reducen la inmunogenicidad del anticuerpo, en comparación con D2E7. En ciertas realizaciones, la inmunogenicidad reducida resulta de la eliminación o mitigación de uno o más epítopos de células B.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de D2E7 se representan por el SEQ ID NO: 2 y el SEQ ID NO: 4, respectivamente, y están codificadas por el SEQ ID NO: 1 y el SEQ ID NO: 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera también se representan en la FIG. 1A. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de D2E7, y sus identificadores correspondientes, se presentan en la FIG. 1B. Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de D2E7, publicadas en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.090.382, se muestran en la FIG. 1C. Se pueden utilizar otras secuencias de nucleótidos cualesquiera que codifican el SEQ ID NO: 2 o el SEQ ID NO: 4 en las composiciones y métodos de la presente descripción en lugar de las secuencias publicadas.

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción que tienen inmunogenicidad reducida tienen unión a TNF- α comparable o mejorada con respecto a D2E7. La afinidad se puede someter a ensayo, por ejemplo, mediante los métodos de validación descritos en la Sección 6.1.

Las sustituciones ilustrativas que producen anticuerpos anti-TNF- α con epítopos de células B eliminados o mitigados y que tienen menor inmunogenicidad, en comparación con D2E7 se enumeran en las FIG. 2 y 3 (es decir, FIG. 3A-3B). Las sustituciones adecuadas incluyen G5F en CDR-L1, G5I en CDR-L1, G5V en CDR-L1, G5W en CDR-L1, G5Y en CDR-L1, R7I en CDR-L1, R7T en CDR-L1, R7V en CDR-L1, N8A en CDR-L1, N8D en CDR-L1, N8E en CDR-L1, N8L en CDR-L1, N8M en CDR-L1, N8Q en CDR-L1, N8R en CDR-L1, A1I en CDR-L2, A1T en CDR-L2, A1V en CDR-L2, T4D en CDR-L2, R2G en CDR-L3, N4F en CDR-L3, N4M en CDR-L3, N4W en CDR-L3, N4Y en CDR-L3, R5L en CDR-L3, R5N en CDR-L3, R5W en CDR-L3, R5Y en CDR-L3, D1S en CDR-H1, Y2A en CDR-H1, Y2C en CDR-H1, Y2K en CDR-H1, Y2M en CDR-H1, Y2R en CDR-H1, Y2S en CDR-H1, Y2V en CDR-H1, H5C en CDR-H1, H5D en CDR-H1, H5E en CDR-H1, H5S en CDR-H1, H5T en CDR-H1, T3A en CDR-H2, T3G en CDR-H2, W4A en CDR-H2, W4F en CDR-H2, W4H en CDR-H2, W4L en CDR-H2, W4M en CDR-H2, W4V en CDR-H2, N5G en CDR-H2, S6D en CDR-H2, S6L en CDR-H2, I9K en CDR-H2, D10L en CDR-H2, Y11A en CDR-H2, Y11C en CDR-H2, Y11E en CDR-H2, Y11F en CDR-H2, Y11G en CDR-H2, Y11H en CDR-H2, Y11I en CDR-H2, Y11K en CDR-H2, Y11L en CDR-H2, Y11M en CDR-H2, Y11N en CDR-H2, Y11Q en CDR-H2, Y11R en CDR-H2, Y11S en CDR-H2, Y11V en CDR-H2, Y11W en CDR-H2, A12Y en CDR-H2, D13N en CDR-H2, V15D en CDR-H2, V15L en CDR-H2, V15M en CDR-H2, V15Q en CDR-H2, V15T en CDR-H2, E16F en CDR-H2, E16H en CDR-H2, E16K en CDR-H2, E16T en CDR-H2, E16W en CDR-H2, G17A en CDR-H2, G17C en CDR-H2, G17E en CDR-H2, G17H en CDR-H2, G17I en CDR-H2, G17K en CDR-H2, G17L en CDR-H2, G17M en CDR-H2, G17P en CDR-H2, G17Q en CDR-H2, G17R en CDR-H2, G17S en CDR-H2, G17T en CDR-H2, G17Y en CDR-H2, V1G en CDR-H3, V1R en CDR-H3, V1W en CDR-H3, L4T en CDR-H3, L4V en CDR-H3, T6V en CDR-H3, S9K en CDR-H3, S9W en CDR-H3, S9Y en CDR-H3, y D11V en CDR-H3.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción pueden comprender cualquier de las sustituciones enumeradas en las FIG. 2 y 3, solas o combinadas, y, opcionalmente, una o más sustituciones adicionales. Las sustituciones en CDR-L1 ilustrativas que producen anticuerpos con epítopos de células T eliminados o mitigados y tienen menor inmunogenicidad, en comparación con D2E7 se enumeran en la Tabla 11 de la Publicación de Estados Unidos Núm. 2010/0266613 A1 y en la Publicación Internacional PCT Núm. 2010/121140.

Las sustituciones y combinaciones de sustituciones adecuadas en CDR-L1 incluyen R7Q; A11S; R7Q + A11S; N8T; N8T + A11S; I6T; A11G; I6T + A11G; Q4G; Q4G + A11S; Q4G + A11G; Q4H; Q4H + A11S; Q4R; Q4R + A11S; G5S; G5S + A11S; N8S + A11S; I6T + A11S; y N8T + A11G.

Las sustituciones ilustrativas que producen anticuerpos con mayor afinidad por TNF- α en comparación con D2E7 se

enumeran en las Tablas 12 y 25 de la Publicación de Estados Unidos Núm. 2010/0266613 A1 y la Publicación Internacional PCT Núm. 2010/121140. Las sustituciones adecuadas incluyen S3K en CDR-L2, S3R en CDR-L2, S3N en CDR-L2, T4H en CDR-L2, T4Q en CDR-L2, T4V en CDR-L2, T4F en CDR-L2, T4W en CDR-L2, T4Y en CDR-L2; L5R en CDR-L2, L5K en CDR-L2, Q6K en CDR-L2, Q6R en CDR-L2, D1G en CDR-H1, Y2H en CDR-H1, A3G en CDR-H1, y T3N en CDR-H2.

Los anticuerpos de la descripción pueden comprender una o más sustituciones descritas en las Tablas 11-25 de la Publicación de Estados Unidos Núm. 2010/0266613 A1 y la Publicación Internacional PCT Núm. 2010/121140.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción pueden ser monoclonales, modificados genéticamente y formas de anticuerpos modificadas de otra manera, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (p.ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos), y fragmentos de anticuerpos unión a antígenos, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, y scFv. Por otra parte, a menos que se indique lo contrario, se pretende que el término "anticuerpo monoclonal" (mAb) incluya tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv) que son capaces de unirse específicamente a una proteína.

Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal o planta, y pueden tener menos unión no específica a tejidos que un anticuerpo intacto (Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316). El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_H1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio C_H1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por escisión del enlace disulfuro en las cisteínas de la bisagra del producto de digestión con pepsina de F(ab')₂. Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de la diana completa. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y ligera en asociación estrecha, no covalente (dímero V_R-V_L). Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo en una única cadena de polipéptido, y también están dentro del alcance de la descripción. Otros anticuerpos abarcados por la descripción incluyen "anticuerpos de dominio único", que se componen de un solo dominio V_R o V_L que exhibe suficiente afinidad por la molécula diana. En una realización específica, el anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de camélido (véase, p.ej., Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38).

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción son preferiblemente anticuerpos monodonaes. El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único don, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago y no al método por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales útiles en relación con la presente descripción se pueden preparar utilizando una amplia variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de presentación de fagos o una combinación de las mismas. Los anticuerpos de la descripción incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados, o humanos.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son monodonaes, a menudo humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En la presente descripción, una de las especificidades de unión puede ser dirigida hacia cualquiera de los dos antígenos, tales como una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada de virus, proteína de la envoltura codificada viralmente, proteína derivada de bacterias, o proteína de la superficie bacteriana, etc.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción incluyen anticuerpos derivatizados. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos derivatizados son típicamente modificados por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas pueden llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales, p.ej., utilizando la tecnología Ambrx (Véase, p.ej., Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2).

En otra realización más de la descripción, los anticuerpos anti-TNF- α pueden ser anticuerpos cuya secuencia se ha modificado para alterar al menos una función efectora biológica mediada por la región constante relativa a la secuencia de tipo salvaje correspondiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos y/o variantes de anticuerpo de referencia de la descripción pueden ser modificados para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante relativa a un anticuerpo no modificado, p.ej., reducción de la unión al receptor Fc (Fc γ R). La unión a Fc γ R se puede reducir mediante la mutación del segmento de la región constante de inmunoglobulina del anticuerpo en regiones particulares necesarias para las interacciones de Fc γ R (Véase, p.ej., Canfield y Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491; y Lund et al., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662). La

reducción de capacidad de unión a FcγR del anticuerpo también puede reducir otras funciones efectoras que se basan en interacciones de FcγR, tales como la opsonización, la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de antígeno ("ADCC").

En otras realizaciones de la descripción, un anticuerpo de referencia y/o variante de anticuerpo se puede modificar para adquirir o mejorar al menos una función efectora biológica mediada por la región constante la relativa a un anticuerpo no modificado, p.ej., para mejorar las interacciones de FcγR (Véase, por ejemplo, el documento US 2006/0134709). Por ejemplo, un anticuerpo de referencia y/o variantes de anticuerpos de la descripción pueden tener una región constante que se une FcγRIIA, FcγRIIB y/o FcγRIIIA con mayor afinidad que la región constante de tipo salvaje correspondiente.

Por lo tanto, los anticuerpos anti-TNF-α de la descripción pueden tener alteraciones en la actividad biológica que dan como resultado el aumento o disminución de la opsonización, la fagocitosis, o la ADCC. Tales alteraciones son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las modificaciones en los anticuerpos que reducen la actividad ADCC se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.834.597. Una variante reductora de ADCC ilustrativa corresponde al "mutante 3" (que se muestra en la Fig. 4 de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.834.597) en el que se suprime el residuo 236 y los residuos 234, 235 y 237 (utilizando la numeración de EU) se sustituyen por alaninas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TNF-α de la descripción tienen bajos niveles de o carecen de fucosa. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con la actividad de ADCC mejorada, especialmente a dosis bajas de anticuerpo. Véanse Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73. Los métodos de preparación de anticuerpos con menos fucosa inducen el crecimiento en células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células YB2/0 expresan bajos niveles de ARN de FUT8, que codifica α-1,6-fucosiltransferasa, una enzima necesaria para la fucosilación de polipéptidos.

En otro aspecto más, los anticuerpos anti-TNF-α pueden ser anticuerpos que han sido modificados para aumentar o reducir sus afinidades de unión al receptor de Fc fetal, FcRn, por ejemplo, mediante la mutación del segmento de la región constante de inmunoglobulina en regiones concretas implicadas en las interacciones de FcRn (Véase, p.ej., el documento WO 2005/123780). En realizaciones concretas, un anticuerpo de referencia y/o variante de anticuerpo de la clase IgG se mutan de tal manera que al menos sólo uno de los residuos de aminoácidos 250, 314, y 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido, o en cualquiera de sus combinaciones, tales como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314, y 428, siendo las posiciones 250 y 428 una combinación específica. Para la posición 250, el residuo de aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de treonina, incluyendo, pero no limitado a, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 314, el residuo de aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de leucina, incluyendo, pero no limitado a, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 428, los residuos de aminoácidos sustituyentes pueden ser cualquier residuo de aminoácido distinto de metionina, incluyendo, pero no limitado a, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina. Estas mutaciones aumentan la unión del anticuerpo a FcRn, que protege el anticuerpo de la degradación y aumenta su semivida.

En otros aspectos, un anticuerpo de referencia y/o variante de anticuerpo tiene uno o más aminoácidos insertados en una o más de sus regiones hipervariables, por ejemplo como describen Jung y Plückthun, 1997, Protein Engineering 10:9, 959-966; Yazaki et al., 2004, Protein Eng. Des. Sel. 17(5):481-9. Epub 17 de agosto de 2004; y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2007/0280931.

Los anticuerpos anti-TNF-α de la descripción incluyen productos conjugados de anticuerpos que están modificados, p.ej., mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de manera que la unión covalente no interfiere en la unión a TNF-α.

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-TNF-α de la descripción se puede conjugar con un radical efector o un marcador. El término "radical efector" según se utiliza en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), radionúclidos, particularmente radiyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados por espectroscopía de RMN o ESR.

En un ejemplo, anti-TNF-α anticuerpos se puede conjugar con un radical efector, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o radical de fármaco para modificar una respuesta biológica dada. El radical efector puede ser una proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo y sin limitación, una toxina (tal como abrina, ricina A, exotoxina de

Pseudomonas, o toxina de la *Difteria*), una molécula de señalización (tal como un interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador tisular del plasminógeno), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico (p.ej., angiostatina o endostatina) o un modificador de la respuesta biológica tal como una citoquina o factor de crecimiento (por ejemplo, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), o factor de crecimiento nervioso (NGF)).

En otro ejemplo los radicales efectores pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos. Los ejemplos de citotoxinas y agentes citotóxicos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los radicales efectores también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p.ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-descarbazina), agentes alquilantes (p.ej., medoretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, camustina (BSNU) y lomustina (CCNU), cidofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C5 y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p.ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocamicinas), y agentes antimetabólicos (p.ej., vincristina y vinblastina).

Otros radicales efectores pueden induir radionúclidos tales como, pero no limitados a, ^{111}In e ^{90}Y , ^{177}Lu , Bismuto- 213 , Californio- 252 , Iridio- 192 y Tungsteno- 188 /Renio- 188 y fármacos tales como, pero no limitados a, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Los mecanismos para conjugar tales radicales efectores con anticuerpos son bien conocidos en la técnica (Véanse, p.ej., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Págs. 623-53 (Robinson et al., eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83:67-123).

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-TNF- α se conjuga con una toxina de molécula pequeña. En ciertas realizaciones ilustrativas, un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción se conjuga con una dolastatina o análogos o derivados peptídicos de dolastatina, p.ej., una auristatina (Patentes de Estados Unidos Núm. 5.635.483 y 5.780.588). El radical de fármaco de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo a través de su extremo N-terminal (amino) o C-terminal (carboxilo) (documento WO 02/088172). Las realizaciones de auristatina ilustrativas incluyen radicales de fármaco de monometilauristatina DE y DF conectados al extremo N-terminal, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.498.298 (que describe, p. ej., conectores y procedimientos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con conectores).

En otras realizaciones ilustrativas, las toxinas de molécula pequeña incluyen, pero no se limitan a caliqueamicina, maitansina (Patente de Estados Unidos Núm. 5.208.020), trioteno, y CC1065. En una realización de la descripción, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maitansina (p.ej., de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y reaccionar con un anticuerpo (Chari et al., 1992, *Cancer Research* 52:127-131) para generar un producto conjugado de fusión de maitansinoide-anticuerpo o maitansinoide-Fc. Los análogos estructurales de caliqueamicina que también pueden usarse incluyen, pero no se limitan a γ_1^1 , γ_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al., 1993, *Cancer Research* 53:3336-3342; Lode et al., 1998, *Cancer Research* 58:2925-2928; Patente de Estados Unidos Núm. 5.714.586; Patente de Estados Unidos Núm. 5.712.374; Patente de Estados Unidos Núm. 5.264.586; Patente de Estados Unidos Núm. 5.773.001).

Los anticuerpos de la descripción también se puede conjugar con liposomas para la administración dirigida (Véase, p.ej., Park et al., 1997, *Adv Pharmacol* 40:399-435; Marty & Schwendener, 2004, *Methods in Molecular Medicine* 109:389-401).

La palabra "marcador" cuando se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectable que se puede conjugar directamente o indirectamente a un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción. El marcador puede ser detectable por sí mismo (p.ej., marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. Los radicales fluorescentes útiles incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Los marcadores enzimáticos útiles incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares.

6.3. Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

Un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción se puede preparar mediante expresión recombinante de los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula anfitriona. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se transfecta una célula anfitriona con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de tal forma que las cadenas ligeras y pesadas se expresan en la célula anfitriona y, opcionalmente, se secretan al medio en el cual se cultivan las células anfitrionas, de cuyo medio se pueden recuperar los anticuerpos. Se utilizan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células anfitrionas, tales como las descritas en *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), Cold Spring Harbor, NY, 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, FM et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.397.

Es posible expresar los anticuerpos de la descripción en cualquiera de las células anfitrionas procariotas o eucariotas. En ciertas realizaciones, la expresión de anticuerpos se lleva a cabo en células eucariotas, p.ej., células anfitrionas de mamífero, para la secreción óptima de un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo. Las células anfitrionas de mamífero ilustrativas para expresar los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO DHFR^r, descritas por Urlaub y Chasin, 1980, en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, p.ej., como describen Kaufman y Sharp, 1982, en *Mol. Biol.* 159:601- 621), células de mieloma NS0, células COS, células 293 y células SP2/0. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes de anticuerpos se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se desarrollan las células anfitrionas .

Las células anfitrionas también se pueden utilizar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para eliminar algunos o todos los ADN que codifican una o ambas cadenas ligeras y pesadas que no es necesario para la unión a TNF- α . Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la descripción.

Para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción, la célula anfitriona puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la descripción, codificando el primer vector un polipéptido de derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Típicamente, los dos vectores contienen cada uno un marcador seleccionable separado. Alternativamente, se puede utilizar un único vector que codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera.

Una vez que se genera un ácido nucleico que codifica una o más porciones de D2E7 o de un anticuerpo anti-TNF- α con secuencias de CDR relacionadas con las secuencias de CDR de D2E7, se pueden introducir en la secuencia codificante alteraciones adicionales o mutaciones, por ejemplo para generar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos con diferentes secuencias de CDR, anticuerpos con afinidad reducida por el receptor de Fc, o anticuerpos de diferentes subclases.

Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción mediante expresión recombinante, éste se puede recuperar y purificar por medio de cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (p.ej., cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente mediante afinidad por TNF- α después de selección con Proteína A o Proteína G, y en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por medio de cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Adicionalmente, los anticuerpos anti-TNF- α de la presente descripción o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en la presente memoria o conocidas por otra parte en la técnica para facilitar la purificación.

Una vez aislado, un anticuerpo anti-TNF- α puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (Véase, p.ej., Fisher, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980)), o mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

6.4. Usos terapéuticos

Los anticuerpos para TNF- α de la presente descripción son útiles para tratar trastornos o síntomas de diversas patologías inmunitarias y autoinmunitarias, así como enfermedades inflamatorias.

Las patologías y enfermedades relacionadas con TNF- α que pueden ser tratadas con el anticuerpo anti-TNF- α de la descripción incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

- patologías inmunitarias y autoinmunitarias agudas y crónicas, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, tiroidosis, enfermedad injerto contra anfitrión, esclerodema, diabetes mellitus, enfermedad de Graves, y similares;
- 5 ▪ Infecciones, incluyendo, pero no limitadas a, síndrome de sepsis, caquexia, colapso circulatorio y choque resultante de infección bacteriana aguda o crónica, enfermedades infecciosas parasitarias y/o bacterianas, virales o fúngicas agudas y crónicas, tales como el SIDA (incluyendo secuelas tales como caquexia, trastornos autoinmunitarios, complejo de demencia e infecciones por SIDA);
- 10 ▪ Enfermedades inflamatorias, tales como patologías inflamatorias crónicas y patologías inflamatorias vasculares, incluyendo patologías inflamatorias crónicas tales como sarcoidosis, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, colitis ulcerosa y patología de Crohn y patologías inflamatorias vasculares, tales como, pero no limitadas a, coagulación intravascular diseminada, aterosclerosis y patología de Kawasaki;
- 15 ▪ Enfermedades neurodegenerativas, incluyendo, pero no limitadas a, enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple y mielitis transversa aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelosos tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelosos; trastornos del movimiento hipercinéticos tales como corea de Huntington y corea senil, trastornos del movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean el SNC, receptores de dopamina;
- 20 trastornos del movimiento hipocinéticos, tales como enfermedad de Parkinson; Parálisis supranuclear progresiva, y Trastornos cerebelosos y espinocerebelosos, tales como lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares (ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph), y trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia, y trastorno mitocondrial multisistémico);
- 25 trastornos desmielinizantes centrales, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda; trastornos de la unidad motora, tales como atrofia muscular neurogénica (degeneración celular del cuerno anterior, tal como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; Síndrome de Down en la mediana edad; enfermedad difusa por cuerpos de Lewy; Demencia senil del tipo cuerpos de Lewy, síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda,
- 30 enfermedad de Hallerorden-Spatz, y Demencia pugilística o cualquiera de sus subconjuntos;
- 35 ▪ Patologías malignas que implican tumores secretores de TNF- α u otros tumores malignos que implican al TNF- α , tales como, pero sin limitarse a leucemias (aguda, mielocítica crónica, linfocítica crónica y/o síndrome mielodisplásico); linfomas (linfomas de Hodgkin y no Hodgkiniano, como linfomas malignos (linfoma de Burkitt o micosis fungoide), y
- 40 ▪ Hepatitis inducida por alcohol.
- 45 En ciertas realizaciones específicas, los anticuerpos de la descripción se utilizan para tratar cualquier indicación para la que está aprobado Adalimumab, por ejemplo, artritis reumatoide (AR) (incluyendo AR moderada o grave en los adultos), la artritis idiopática juvenil poliarticular (AIJ) (incluyendo AIJ moderada a severa en pacientes de 4 años de edad y mayores), artritis psoriásica (APs) (incluyendo la artritis psoriásica en adultos), espondilitis anquilosante (EA) (incluyendo EA en adultos), enfermedad de Crohn (EC) (incluyendo EC moderada o grave en adultos), psoriasis, p.ej., psoriasis en placas crónica (Ps) (incluyendo psoriasis en placas crónica moderada a severa en adultos), y
- 50 espondiloartritis axial (EsAax) (incluyendo EsAax grave en pacientes adultos que no tienen evidencia de rayos X de daño estructural).
- 55 Por consiguiente, la presente descripción proporciona métodos para tratar cualquiera de las enfermedades anteriores en un paciente que lo necesite, que comprende: administrar al paciente un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción. Opcionalmente, dicha administración se repite, por ejemplo, después de un día, dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas o un mes. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. La administración puede repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces, o más. Por ejemplo, de acuerdo con ciertos regímenes de dosificación un paciente recibe la terapia anti-TNF- α durante un período de tiempo prolongado, p.ej., 6 meses, 1 año o más. La cantidad de anticuerpo anti-TNF- α administrado al paciente es en ciertas realizaciones una cantidad terapéuticamente eficaz. Según se utiliza en la presente memoria, una cantidad "terapéuticamente eficaz" de anticuerpo contra TNF- α se puede administrar como una dosis única o en el transcurso de un régimen terapéutico, p.ej., en el transcurso de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año, o más.
- 60 Una dosis típica dependerá del paciente y la gravedad de la enfermedad, pero típicamente oscila de 10 mg a 160 mg (p.ej., 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg, 140 mg, o 160 mg. En realizaciones específicas, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TNF- α , o un método de tratamiento de uno o más de los trastornos descritos en la presente memoria, en un intervalo de dosificación enmarcado por cualquiera de los valores anteriores. El régimen terapéutico en el que

se administra el anticuerpo anti-TNF- α de la descripción variará dependiendo de la edad, peso y la enfermedad del paciente. El régimen terapéutico puede continuar durante 2 semanas a indefinidamente. En realizaciones específicas, el régimen terapéutico continúa durante 2 semanas a 6 meses, de 3 meses a 5 años, de 6 meses a 1 o 2 años, de 8 meses a 18 meses, o similares. El paciente al que se administra un anticuerpo anti-TNF- α de la descripción es preferiblemente un ser humano. En ciertos aspectos, el humano es un paciente pediátrico. En otros aspectos, el ser humano es un paciente adulto.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción se pueden administrar combinados con al menos otro agente terapéutico (un "segundo agente terapéutico"). El anticuerpo anti-TNF- α y el segundo agente terapéutico se pueden administrar concurrentemente (simultánea o secuencialmente) o por separado.

En ciertos aspectos, el segundo agente terapéutico es un fármaco anti-reumático, un agente antiinflamatorio, un agente quimioterapéutico, un radioterapéutico, un agente inmunosupresor, o un fármaco citotóxico.

Los fármacos anti-reumáticos incluyen, pero no se limitan a, auranofina, azatioprina, cloroquina, D-penicilamina, tiomalato sódico de oro hidroxiclороquina, Miocrisina y sulfasalazina metotrexato.

Los agentes anti-inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, dexametasona, pentasa, mesalazina, asacol, fosfato de codeína, benorilato, fenbufeno, naprosina, didofenaco, etodolaco e indometacina, aspirina e ibuprofeno.

Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas radiactivas, toxinas, también conocidas como citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluyen cualquier agente que es perjudicial para la viabilidad de las células, agentes, y liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a 1-deshidrotosterona, 5-fluorouracilo, descabazina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleudina, agentes alquilantes, alopurinol sódico, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC)), agentes anti-mitóticos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, diamino dicloro platino, antracinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), fosfato sódico de betametasona y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfan, leucovorina de calcio, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), camustina (BSNU), Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, Colchicina, estrógenos conjugados, Ciclofosfamida, Ciclotofamida, Citarabina, Citarabina, citocalasina B, Citoxano, Dacarbazina, Dactinomicina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina HCl, citrato de daunorrubicina, denileucina difitox, Dexrazoxano, Dibromomantol, dihidroxiantracina, Docetaxel, mesilato de dolasetrón, doxorubicina HCl, dronabinol, L-asparaginasa de E. coli, emetina, epoetina- α , L-asparaginasa de Erwinia, estrógenos esterificados, estradiol, fosfato sódico de estramustina, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, etopósido factor de citrovorum, fosfato de etopósido, filgrastim, flouxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido fólico, gemcitabina HCl, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetron HCl, hidroxiurea, idarubicina HCl, ifosfamida, interferón α -2b, irinotecan HCl, letrozol, leucovorina cálcica, acetato de leuprolida, levamisol HCl, lidocaína, lomustina, maitansinoide, medoretamina HCl, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán HCl, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreotida, ondansetrón HCl, paclitaxel, pamidronato disódico, pentostatina, pilocarpina HCl, plimicina, polifeprosan 20 con implante de camustina, porfímero sódico, procaina, procarbazona HCl, propranolol, rituximab, sargramostim, estreptozotocina, tamoxifeno, taxol, tenipósido, testolactona, tetracaina, tiotepa, clorambucilo, tioguanina, tiotepa, topotecán HCl, citrato de toremifeno, D2E7, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, y tartrato de vinorelbina.

En otros aspectos más de la descripción, el segundo agente terapéutico es un antagonista TNF- α distinto del anticuerpo anti-TNF- α de la descripción. Los ejemplos de tales antagonistas de TNF- α incluyen, pero no se limitan a, receptores de TNF- α solubles; etanercept (ENBREL; Immunex) o uno de sus fragmentos, derivados o análogos; infliximab (REMICADE; Centacor) o uno de sus derivados, análogos o fragmentos de unión a antígeno; IL-10, que se sabe que bloquea la producción de TNF- α través de macrófagos activados por interferón- γ (Oswald et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8676-8680), TNFR-IgG (Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539); el producto murino TBP-1 (Serono/Yeda); la vacuna CytoTab (Protherics); la molécula antisentido 104838 (ISIS); el péptido RDP-58 (SangStat); talidomida (Celgene); CDC-801 (Celgene); DPC-333 (Dupont); VX-745 (Vertex); AGIX-4207 (AtheroGenics); ITF-2357 (Italfarmaco); NPI-13021-31 (Nereo); SCIO-469 (Scios); diana TACE (Immunix/AHP); CLX-120500 (Calyx); Tiazolopirim (Dynavax); auranofina (Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals); quinacrina (dihidrocloreto de mepacrina); tenidap (Enablex); Melanina (Gran Escala Biológica); y MAPK agentes anti-p38 de Uriach.

Los segundos agentes terapéuticos adicionales útiles combinados con un anticuerpo anti-TNF- α y las indicaciones concretas para las que la terapia combinada con tales segundos agentes terapéuticos sean útiles se describen en el documento WO 2004/004633.

6.5. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un paciente. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo anti-TNF- α y un portador farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p.ej., soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, y polvos. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles. El modo preferido de administración es parenteral (p.ej., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo anti-TNF- α se administra mediante infusión intravenosa o inyección. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-TNF- α se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Los anticuerpos anti-TNF- α de la descripción se pueden proporcionar en kits farmacéuticos. El kit farmacéutico es un paquete que comprende el anticuerpo anti-TNF- α de la descripción (p.ej., ya sea en forma liofilizada o como una disolución acuosa) y opcionalmente uno o más de los siguientes: un segundo agente terapéutico, por ejemplo como se describe anteriormente; un dispositivo para administrar el anticuerpo anti-TNF- α , por ejemplo una pluma, aguja y/o la jeringa; y agua o tampón de calidad farmacéutica para resuspender el anticuerpo si el anticuerpo está en forma liofilizada.

En ciertos aspectos, cada dosis unitaria del anticuerpo anti-TNF- α se empaqueta por separado, y un kit puede contener una o más dosis unitarias (p.ej., dos dosis unitarias, tres dosis unitarias, cuatro dosis unitarias, cinco dosis unitarias, ocho dosis unitarias, diez dosis unitarias, o más). En una realización específica, la una o más dosis unitarias están cada una alojadas en una jeringa o pluma. Una dosis unitaria típica comprende de 10 mg a 160 mg de un anticuerpo anti-TNF- α (p.ej., 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg, 140 mg, o 160 mg). En realizaciones específicas la presente descripción proporciona una dosis unitaria que comprende un anticuerpo anti-TNF- α en un intervalo enmarcado por cualquiera de los valores anteriores.

Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (p.ej., un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. En una realización específica, el anticuerpo y uno o más aditivos pueden ser proporcionados (individualmente o combinados) como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución que tiene la concentración apropiada.

7. Ejemplos

7.1. Ejemplo 1: Vectores para su expresión y presentación en la superficie celular.

Los dominios ligeros variables (V_L) y pesados variables (V_H) para D2E7 (Adalimumab) fueron construidos por un proveedor comercial de síntesis de genes (DNA 2.0 Inc., Menlo Park, CA). Las FIG. 1A-1C muestran las secuencias de ADN, las secuencias de aminoácidos traducidas, los sitios de restricción flanqueantes, y las CDR de los fragmentos V_H y V_L sintéticos de D2E7. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se indican mediante texto subrayado en negrita. Los V_H y V_L de D2E7 sintéticos se donaron en el vector pYA206, un vector episomal derivado del virus de Epstein-Barr para la expresión y la presentación de anticuerpos en la superficie de células de mamífero. pYA206 es un derivado del plásmido pYA104 (Akamatsu et al., J. Immunol Methods, 31 de octubre de 2007; 327(1-2):40-52) con las siguientes modificaciones: 1) el dominio constante C lambda humano ha sido sustituido por el dominio constante de C kappa humano, 2) la señal de conexión de glicosidilfosfatidilinositol (ancla de GPI) ha sido reemplazada por el dominio transmembrana del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), 3) los sitios NotI y XhoI únicos están aguas arriba del dominio C kappa para la clonación de los dominios V_L en marco con C kappa, y 4) los sitios NgoMIV y SacI únicos están aguas arriba de IgG₁ para la clonación de los dominios V_H en marco con las regiones constantes de IgG₁.

pCW600 es un derivado del plásmido pYA206, con el gen CH sustituido por Fab.

El fragmento V_H de D2E7 se digirió con NgoMIV y SacI, y el fragmento V_L de D2E7 se digirió con NotI y XhoI. Ambos

fragmentos se clonaron en el plásmido pYA206 para crear el plásmido pYA206-D2E7. La FIG. 4 muestra la estructura de pYA206-D2E7. Este plásmido contiene el gen EBNA-1 y oriP del virus de Epstein Barr que permite la replicación en células de mamífero como un episoma. El origen de replicación de pUC y gen de resistencia a ampicilina permiten que el plásmido se pueda propagar en *E. coli*. Los transformantes de células de mamífero se seleccionan con el gen de resistencia a puromicina bajo el control del promotor de SV40. El promotor de CMV y el sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) permiten la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo presentado. El anticuerpo expresado se ancla a la membrana celular a través del dominio transmembrana PDGF-R fusionado al extremo del dominio constante de IgG₁.

El fragmento V_H de D2E7 se digirió con NgoMIV y SacI, el fragmento V_L de D2E7 se digirió con NotI y XhoI, y los dos fragmentos se clonaron en el plásmido pCW600 para crear el plásmido pCW600-D2E7. La FIG. 4 muestra la estructura de pCW600-D2E7. Este plásmido contiene el gen EBNA-1 y oriP del virus de Epstein Barr que permiten la replicación en células de mamífero como un episoma. El origen de replicación de pUC y el gen de resistencia a ampicilina permiten que el plásmido se pueda propagar en *E. coli*. Los transformantes de células de mamífero se seleccionan con el gen de resistencia a puromicina bajo el control del promotor de SV40. El promotor de CMV y el sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) permiten la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de Fab presentadas. El Fab expresado se ancla a la membrana celular a través del dominio transmembrana de PDGF-R fusionado al extremo del dominio constante de IgG₁.

7.2. Ejemplo 2: Presentación en superficies y análisis de titulación FACS de D2E7

Las células 293c18 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA), que expresan la proteína EBNA-1, se transformaron con pYA206-D2E7. Las células 293c18 se cultivaron en medio DMEM con un suplemento de suero bovino fetal (FBS) al 10% y 0,25 mg/ml de G418. Se mezclaron 0,125 µg de plásmido pYA206-D2E7 o pCW600-D2E7 1:200 con 25 µg pUC19 como un plásmido portador más 60 µl de lipofectamina (Invitrogen, CA) y se añadieron a 2x10⁷ células 293c18. El plásmido portador en exceso de 200 veces fue para garantizar que cada célula era transformada a lo sumo por un solo plásmido que contenía D2E7. Después de 48 horas, las células transformadas se seleccionaron mediante la adición de puromicina, y después se cultivaron durante 18 días adicionales antes del análisis FACS.

El TNF-α humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) se marcó con Alexa Fluor 647 (Invitrogen, CA). Se hizo reaccionar 1 mg de TNF-α humano con 84 µg de reactivo Alexa Fluor 647 durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se purificó del reactivo que no había reaccionado utilizando una columna de filtración en gel. Las células 293c18 transfectadas con pCW600-D2E7 se tiñeron doblemente con anti-IgG humana marcado con PE (Southern Biotech) a una dilución de 1/200 y diversas concentraciones de TNF-α marcado con Alexa Fluor 647 en hielo durante una hora, se lavaron con tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato (PBS) más albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5%) y se analizaron en un FACSCalibur (BD). Se realizó una curva de titulación con concentraciones de TNF-α marcado con Alexa Fluor 647 que oscilaban de 20 nM a 0,26 nM. El punto medio de cada curva, en el que se produce la unión semimáxima, se definió como CE₅₀ para el complejo anticuerpo/antígeno. Los resultados para D2E7 de tipo salvaje se muestran en la FIG. 5. El Fab de D2E7 presentado en la superficie se une a TNF-α con una CE₅₀ 0,15 nM en este análisis.

Los anticuerpos anti-D2E7 1H11, 5A1, y 10F8 (anti-idiotipos, anti-Id) se conjugaron con biotina. Se hizo reaccionar 1 mg de cada anti-Id con 43 µg de reactivo Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) durante dos horas a temperatura ambiente. El exceso de biotina se eliminó mediante centrifugación en un filtro de microcentrífuga Amicon. Las células 293c18 transfectadas con pCW600-D2E7 se tiñeron doblemente con anti-IgG humana marcado con PE (Southern Biotech) a una dilución 1/200 y anti-Id biotinilados durante 1 hora, se lavaron con tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato (PBS) más albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5%), a continuación se tiñeron con una dilución 1/200 de estreptavidina-APC. Se realizó una curva de titulación con concentraciones de anti-Id que oscilaban de 20 nM a 0,26 nM. El punto medio de cada curva, en el que se produce la unión semimáxima, se define como EC₅₀ para el complejo anti-Id/D2E7. El resultado para cada anti-idiotipo se muestra en la FIG. 6. El Fab de D2E7 presentado en la superficie se une a los anti-Id 1H11, 5A1, y 10F8 con una CE₅₀ de 0,77 nM, 0,37 nM, y 1,28 nM, respectivamente, en este análisis.

7.3. Ejemplo 3: Construcción de bibliotecas de mutantes en un solo aminoácido de D2E7

Cada posición de aminoácido de CDR de D2E7 (subrayada en la FIG 1A) - un total de 34 posiciones V_H y 27 posiciones V_L - se eligió como diana para la aleatorización NNK. Se utilizó el esquema de codificación NNK (en el que N = A, C, G o T y K = G o T) porque: 1) sólo son necesarios 32 codones para codificar los 20 aminoácidos de origen natural, 2) sólo se incluye un único codón de parada (TAG) en los 32, y 3) la máxima degeneración (número de diferentes codones que codifican un único aminoácido) es 3, en lugar de la máxima degeneración de 6 veces que se produce en el código genético de 64 codones completo.

Los 61 diferentes fragmentos de ADN, cada uno con degeneración NNK en una posición CDR diferente, fueron

5 sintetizados por un proveedor comercial de genes sintéticos (DNA 2.0, Menlo Park, CA). Estos fragmentos se amplificaron mediante PCR con cebadores D2E7reampFwd (5'-CTCGAAAATAATAAGGGGAAATCAG-3') (SEQ ID NO: 11) y D2E7reampRev (5'-TGGTAGTGTGGGGACTC-3') (SEQ ID NO: 12). Los productos de PCR se purificaron, a continuación los fragmentos V_H se digirieron con NgoMIV y SacI, y los fragmentos V_L se digirieron con NotI y XhoI. Todos los fragmentos se sometieron a ciclos de cromatografía en un gel de agarosa, se purificaron, y se subclonaron en el plásmido pCW600-D2E7 que portaba el fragmento de la región variable de tipo salvaje opuesto. Los plásmidos resultantes se transformaron por separado en células E. coli Top 10 (Invitrogen, CA) para formar una sub-biblioteca de transformantes para cada uno de los 61 fragmentos de ADN diferentes. Las transformaciones se llevaron a cabo de tal manera que se obtuvieron al menos 10 veces más transformantes de E. coli que el número total de posibles codones en cada sub-biblioteca. Los sub-bibliotecas resultantes para V_H y V_L se reunieron para crear dos bibliotecas finales - una biblioteca V_H de D2E7 que comprende 34 posiciones y 1088 codones diferentes, y una biblioteca V_L de D2E7 que comprende 27 posiciones y 864 codones totales diferentes.

7.4. Ejemplo 4: Tinción FACS y clasificación de 4 vías de bibliotecas de Fab mutantes puntuales de V_H y V_L de D2E7 para determinar la unión de TNF- α

Las bibliotecas de V_H y V_L de D2E7 se transfectaron en células 293c18 con 0,5 μ g de plásmido de la biblioteca, 100 μ g de plásmido portador de pUC19 y 250 μ l de lipofectamina, se seleccionaron con 0,8 μ g/ml de puomicina después de 2 días, y se cultivaron durante 18 días adicionales antes de la clasificación mediante FACS. Las células se tiñeron con TNF- α con Alexa Fluor 647 0,15 nanomolar y anti-IgG marcado con PE 1: 200 (Southern Biotech) y se clasificaron en una máquina FACS MoFlo (Dako North America Inc., Carpinteria, CA). Los perfiles de la clasificación FACS para las bibliotecas de D2E7 de tipo salvaje y mutación puntual de V_H se muestran en las FIG. 7A-7B. El panel A muestra el perfil de FACS para células transformadas con el plásmido de expresión de Fab de D2E7 de tipo salvaje pCW600; el eje x muestra la tinción con anti-IgG-PE y el eje y muestra la tinción con TNF- α con Alexa Fluor 647. Debido a que la expresión de los anticuerpos es heterogénea en la población celular, el perfil de FACS muestra datos individuales dispuestos aproximadamente a lo largo de una línea diagonal que apunta hacia el cuadrante superior derecho.

Las células teñidas con TNF- α de la biblioteca de mutación puntual de V_H se clasificaron en 4 subpoblaciones basándose en las ventanas de análisis de FACS (FIG. 7A-7B, panel B). El comportamiento del anticuerpo de tipo salvaje en condiciones de FACS similares se utiliza para establecer ventanas de análisis para clasificar las células en una población de afinidad más alta (H) (R4), una población de afinidad neutra o 'media' (M) (R5), una población de afinidad inferior (L) (R6), y una población que no expresa IgG (Z) (R3). El eje x muestra la tinción anti-IgG-PE y el eje y muestra la tinción con TNF- α -AF647 humano.

7.5. Ejemplo 5: Tinción FACS y clasificación de dos vías de bibliotecas de Fab mutantes puntuales de V_H y V_L de D2E7 para determinar la unión de anti-Id

Las células que expresan D2E7 se tiñeron concurrentemente con TNF- α con Alexa Fluor 647 0,15 nanomolar y mAbs anti-idiotípicos biotinilados a CE₅₀ (1H11 a 0,77 nM, 5A1 a 0,37 nM, y 10F8 a 1,28 nM), después se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con estreptavidina-APC y anti-IgG kappa humano-FITC durante una hora a 4°C. Las células se lavaron, a continuación, se clasificaron en una máquina FACS MoFlo (Dako North America Inc., Carpinteria, CA). Los perfiles de clasificación FACS para D2E7 de tipo salvaje y la biblioteca de V_H teñida con 1H11 se muestran en las FIG. 8A-8B. La tinción anti-IgG-PE se muestra en el eje x y la tinción anti-Id1H11-APC se muestra en el eje y. Se realizó una clasificación de 2 vías, recogiendo un mínimo de dos millones de células en las ventanas de análisis de "clasificación" (células con baja unión al anticuerpo anti-idiotipo) y "expresión" (células positivas para anti IgG Kappa humanos-FITC).

Debido a que la expresión del anticuerpo es heterogénea en la población celular, el perfil de FACS muestra datos individuales dispuestos aproximadamente a lo largo de una línea diagonal que apunta hacia el cuadrante superior derecho. Los perfiles de FACS para la biblioteca de mutación puntual WT y V_H de D2E7 se muestran en la FIG. 8, paneles A y B, respectivamente. Con el fin de recoger una población de células de referencia para cada biblioteca que contiene todas las mutaciones puntuales expresadas en sus frecuencias correctas en la biblioteca, las ventanas de análisis se dibujaron con el borde izquierdo paralelo al eje y; la clasificación con estas ventanas de análisis recoge todas las células que expresan IgG por encima de un cierto nivel, independientemente de lo bien que se unan a anti-Id los anticuerpos presentados. Éstas se denominaron "ventanas de análisis de expresión" y "poblaciones expresadas" (panel B "R4"). Se realizaron otras clasificaciones con la parte superior de la ventana de análisis dibujada aproximadamente paralela a y directamente por debajo de la diagonal principal de la población de tipo salvaje; estas ventanas de análisis se diseñaron para recoger las células que expresaban anticuerpos con disminución de la afinidad de unión por el anti-idiotipo, independientemente de su nivel global de expresión de IgG. Estas ventanas de análisis y poblaciones fueron referidas "ventanas de análisis de clasificación" y "poblaciones clasificadas" (panel B "R3"). Se recogieron aproximadamente 2.000.000 células en la puerta tanto de "clasificación" como de "expresión".

7.6. Ejemplo 6: Secuenciación masiva en paralelo de las poblaciones "expresadas" y "clasificadas"

Los plásmidos se recuperaron de las poblaciones de células "expresadas" y "clasificadas" y se realizó la amplificación PCR para preparar amplicones cortos adecuados para la secuenciación masiva en paralelo. Se utilizaron cebadores de PCR que se reasociaron inmediatamente fuera de las regiones CDR1 y CDR3 del dominio V_H y V_L de D2E7. Los cebadores fueron: cebador directo de V_H D2E7_VH_CDR1_for 5'- TTAGTTGTGCTGCATCAGGTTT-3' (SEQ ID NO: 13); cebador inverso de V_H D2E7_VH_CDR3_rev 5'- GGTCACCAGTGTCCCTGAC-3' (SEQ ID NO: 14); cebador directo de V_L D2E7_VL_CDR1_for 5'-GTAGGCGACAGGGTCACAAT-3' (SEQ ID NO: 15); y cebador inverso de V_L D2E7_VL_CDR3_rev 5'-AGTCCGTTTGATCTCGACCTT-3' (SEQ ID NO: 16). Por lo tanto, cada amplicón contenía las regiones CDR 1, CDR2, y CDR3 completas para la localización y la tabulación de todas las mutaciones puntuales, pero omitía la mayor parte de los marcos 1 y 4. Los amplicones "clasificados" y "expresados" de la biblioteca de V_H y V_L de D2E7 fueron secuenciados utilizando Genome Sequencer FLX de acuerdo con los instrucciones del fabricante. (454 Life Sciences, Branford, CT).

Se utilizó un programa de ordenador para examinar las secuencias y tabular el número de veces que cada mutación puntual se encontró en las poblaciones "expresadas" y "clasificadas". El programa de ordenador lee inicialmente y tabula cada codón. Para los aminoácidos con más de un codón, el programa añade la aparición de los diferentes codones de cada aminoácido juntos para preparar un resumen general del comportamiento de esa variante de aminoácido en cada subpoblación.

Para la clasificación de 4 vías de las bibliotecas de D2E7 para evaluar la unión a TNF- α , se proporciona una Puntuación de la Razón del Enriquecimiento (RE) a cada variante de codones. La RE indica cuánto más o menos frecuentemente se encuentra la variante en la población H en comparación con su frecuencia global. Del mismo modo, se pueden calcular las razones de enriquecimiento para cada variante en cada una de las poblaciones M, L y Z. Se espera que en la población H resulte enriquecida con las variantes de mayor afinidad (RE > 1) y la población L empobrecida (RE < 1). Por el contrario, se espera que la población H resulte empobrecida con los mutantes de afinidad más baja (RE < 1) y la población L enriquecida (RE > 1). Es posible identificar las variantes de afinidad superior, inferior, y neutra simplemente observando las Razones de enriquecimiento para la población H.

En el análisis FACS de 2 vías para evaluar la unión de las bibliotecas D2E7 a anti-idiotipos, la población "clasificada" contiene variantes que se unen menos al anti-idiotipo. En este caso, una RE mayor de variantes clasificadas indica una disminución de la unión a los anticuerpos anti-idiotipo.

7.7. Ejemplo 7: Identificación de mutantes puntuales con las propiedades deseadas

Para analizar los datos, el número de veces que una mutación se encuentra en una posición dada es normalizada al número de veces que esa posición es secuenciada y expresada como una frecuencia por 1000 secuencias. A continuación, la frecuencia de la mutación en la población clasificada se divide por la frecuencia en la población expresada para proporcionar la Razón de Enriquecimiento (RE) que indica si la mutación ha sido enriquecida o empobrecido en la población clasificada en comparación con la población expresada, y en qué grado. Las mutaciones en las que se enriquece la población clasificada tendrán aumento unión a TNF- α , mientras que las mutaciones en las que se empobrecen tendrán disminución de la unión. De manera similar, las células clasificadas que tenían disminución de la unión a anti-idiotipos tendrán una alta Razón de Enriquecimiento para ese anti-idiotipo concreto.

7.8. Ejemplo 8: Análisis de codones de tipo salvaje silenciosos

Al determinar en qué variantes se ha enriquecido o empobrecido una biblioteca en una subpoblación clasificada es útil comparar el comportamiento de las variantes con el comportamiento de la proteína de tipo salvaje bajo las mismas condiciones experimentales. Esto se puede realizar fácilmente siguiendo el comportamiento de codones WT silenciosos - secuencias de ADN variantes que codifican una proteína WT pero que contienen un cambio de codón silencioso resultante de la aleatorización NNK. Por ejemplo, en una posición de la biblioteca en la que el codón de tipo salvaje es GGG (glicina), la aleatorización NNK producirá un codón GGT, que también codifica glicina, pero que puede ser utilizado en los procedimientos de clasificación y análisis estadístico descritos en la presente memoria como cualquier otra variante. Dependiendo del codón de partida, en cualquier lugar pueden aparecer de cero a tres codones de tipo salvaje silenciosos en cualquier posición; en la práctica esto asegura que varias docenas de codones silenciosos de tipo salvaje estarán disponibles en una biblioteca típica de CDR cubriendo 50-65 posiciones diferentes. El promedio de estas razones de enriquecimiento de tipo salvaje silenciosos se puede utilizar para determinar el punto medio de un experimento; las variantes de afinidad mejoradas se encuentran por encima de este punto medio, las variantes de menor afinidad se encuentran por debajo de este punto medio, y las variantes neutras se encuentran en la proximidad del punto medio. La FIG. 9 muestra los resultados de un análisis de codones de tipo salvaje silenciosos. Las mutaciones beneficiosas (es decir, aquellas con una disminución de la unión a anti-idiotipo 1H11 y unión neutra a TNF- α) tendrían una RE para 1H11 mayor de 0,25 (media + 1 DT) y una RE para TNF- α entre 1,21 y 1,59 (media +/- 1 DT).

7.9. Ejemplo 9: Análisis FACS de un punto

Para predecir posiciones en las CDR que conducirían a la disminución de la unión a anti-idiotipos, las células 293c18 sembradas en placas de 96 pocillos se transfectaron con sub-bibliotecas con sólo una posición mutado para 32 codones posibles (FIG. 10). Después de dos días en cultivo, se recogieron las células y se tiñeron con anti-idiotipos a CE₅₀ conjugados con PE y TNF- α -647 a CE₅₀. El análisis FACS mostró posiciones con una gran población de células con baja unión al anti-idiotipo. La FIG. 11 muestra que algunas posiciones (en el círculo) en V_H pueden mutarse para disminuir la unión a 1H11 y que ninguna posición V_L puede conducir a un efecto similar. Del mismo modo, la FIG. 12 muestra que la unión de anti-idiotipos 5A1 y 10F8 puede disminuirse por mutaciones en ciertas posiciones en la cadena V_L. Las mutaciones en la cadena V_H no disminuyen la unión a 5A1 y 10F8.

Un modelo Pymol de D2E7 con las posiciones en V_H que se pronosticaba que eran importante para la unión a 1H11 en gris se muestra en las FIG. 13A-13D. El epítipo pronosticado muestra que, aunque las posiciones se encuentran dispersas entre las tres CDR, éstas son adyacentes en el modelo y forman un epítipo conformacional y discontinuo. Del mismo modo, las FIG. 14A-14D muestran que las posiciones en V_L importantes en la unión a 5A1 y 10F8 forman una conformación o epítipo discontinuo.

Para confirmar la disminución de la unión al anti-idiotipo, se expresa un único mutante de IgG completa en la superficie celular, a continuación se tiñeron con anti-idiotipo conjugado con AF647 en EC₅₀ y anti-IgG-PE. Para confirmar unión neutra a secuencias diana, se tiñe IgG completa en la superficie celular con TNF- α -AF647 a CE₅₀ y anti-IgG-PE.

Se mutó CDR1-2 (Y32) de V_H de Y a K, R, S, T, o V. La FIG. 15 muestra un análisis FACS de un punto de los mutantes. La tinción FACS con el anticuerpo anti-idiotipo 1H11 confirma la disminución de la unión de todas las variantes. La tinción TNF- α muestra unión neutra para todos los mutantes excepto para T, correlacionándose con la RE inferior de este mutante en la FIG. 16. Las mutaciones beneficiosas en V_L de D2E7, que se muestran en la FIG. 16, se seleccionaron como las que tienen una disminución de la unión a 1H11 (RE para 1H11 superior a 0,25) y una unión neutra a TNF- α (RE para TNF- α de 1,21 a 1,60). En color gris son las mutaciones no deseadas.

La FIG. 17 proporciona Razones de Enriquecimiento medias para 1H11 por posición. Las posiciones en V_H de D2E7 con una alta RE media tienen más sustituciones de aminoácidos posibles que conducen a un anticuerpo con una disminución de la unión a anti-Id 1H11.

La FIG. 18 proporciona Razones de Enriquecimiento medias para 5A1 por posición. Las posiciones en V_L de D2E7 con una alta RE media tienen más sustituciones de aminoácidos posibles que conducen a un anticuerpo con una disminución de la unión a anti-idiotipo 5A1.

La FIG. 19 proporciona Razones de Enriquecimiento medias para 10F8 por posición. Las posiciones en V_L de D2E7 con una alta RE media tienen más sustituciones de aminoácidos posibles que conducen a un anticuerpo con una disminución de la unión a anti-idiotipo 10F8.

7.10. Ejemplo 10: Análisis de formación de puentes de D2E7

Se desarrolló un análisis de formación de puentes de D2E7 para visualizar la unión de D2E7 a anticuerpos anti-Adalimumab (ADAb) obtenidos a partir de donantes humanos. Las placas de ELISA de alta unión Immobilon se recubrieron con 0,5 μ g/ml de anticuerpo D2E7 de tipo salvaje en PBMS a 4°C durante la noche. Al día siguiente las placas se lavaron con PBS que contenía Tween-20 al 0,1% (PBS/Tween). Las placas se bloquearon con suero AB humano al 1% en PBS (huAB/PBS) a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Se diluyeron muestras de suero humano (Bioreclamation, NY) en huAB/PBS y se añadieron a las placas de ELISA. Finalmente, se añadió anticuerpo D2E7 de tipo salvaje biotinilado a una concentración final de 15 ng/ml. Las placas se incubaron a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron en PBS/Tween. Se diluyó estreptavidina-HRPO (MABTECH) 1:1000 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante en huAB/PBS y se añadieron 100 μ l/pocillo a las placas. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron una vez con PBS/Tween y dos veces con agua destilada. Se añadió TMB One Component (BioFX Laboratories) y el color se desarrolló durante 15 minutos. Las placas se leyeron a 650 nm. Se incluyó un control positivo (anticuerpo monodonal murino anti-D2E7 humano).

7.11. Ejemplo 11: Análisis de inhibición para validar mutantes puntuales de V_H y V_L de D2E7

Se escrutaron muestras de suero disponibles comercialmente de donantes humanos con Adalimumab, pero no con metotrexato, como medicamento en sus formularios de consentimiento para determinar la presencia de anti-Adalimumab ("ADAb") utilizando el análisis de formación de puentes del Ejemplo 10. Los donantes que mostraron evidencia de ADAb fueron seleccionados para un estudio adicional. La especificidad del ADAb fue confirmada mediante la realización de análisis de inhibición utilizando los controles positivos y negativos descritos a

continuación. Los ADAbs de los donantes seleccionados fueron específicos para el fragmento Fab de D2E7.

Se escrutaron los anticuerpos variantes identificados por tener reducción de la unión a anticuerpos murino anti-idiotipo, en comparación con D2E7 para determinar la inhibición del análisis de formación de puentes de D2E7. La inhibición del análisis de formación de puentes por un anticuerpo variante muestra que la variante es todavía susceptible de unirse a los ADAbs del suero del paciente. Por lo tanto, las variantes que no interfieren en el análisis de formación de puentes no presentan reacción cruzada con el ADAbs y por lo tanto representan mutaciones dentro del epítipo de unión al anticuerpo de D2E7.

Se recubrieron durante la noche placas de ELISA Immobilon con 0,5 µg/ml de D2E7 de tipo salvaje, se lavaron y se bloquearon. En una placa de 96 pocillos separada, se diluyeron anticuerpos variantes D2E7 en huAb/PBS a 10 µg/ml. Cada variante se sometió a ensayo por duplicado. Se utilizaron anticuerpos IgG₁, herceptina y DP10, no relacionados con D2E7, como controles negativos para determinar la unión de anticuerpos anti-Adalimumab. El anticuerpo D2E7 de tipo salvaje se utilizó como control positivo para determinar la inhibición. Los fragmentos Fab de DP10 y D2E7 también se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. El suero de los donantes que exhibían una respuesta inmunitaria a Adalimumab se diluyó 1:25 en huAB/PBS, y se añadieron 100 µl a los pocillos que contenían las variantes y los controles. La concentración final de suero del donante fue de 1:50. Se transfirieron 100 µl del suero diluido con variantes y controles agregados a las placas recubiertas con D2E7. Se añadieron inmediatamente a las placas 100 µl de D2E7 biotinilado a 30 ng/ml en huAB/PBS. Las placas se incubaron a 4°C durante la noche. El día siguiente las placas se lavaron, y se añadió estreptavidina-HRP diluida. Las placas se lavaron una vez con PBS/Tween-40, y se añadió TMB One Component (BioFX Laboratories) y el color se desarrolló durante 15 minutos. Las placas se leyeron a 650 nm.

El anticuerpo DP10 no relacionado se incluyó como un control en todas las pruebas y no tuvo impacto en la unión de ADAbs a D2E7 en las placas. El porcentaje de inhibición de ADAbs a DP10 promedió 88 +/- 12%. El análisis de inhibición se llevó a cabo con muestras de suero positivas para ADAbs de cuatro donantes comerciales. Los resultados se superpusieron en gran medida para los cuatro donantes, con cambios en CDR3 de V_H que tenía el mayor impacto en unión de ADAbs (FIG. 20A-20B). Las variantes preferidas se seleccionaron de dos maneras: la FIG. 21A muestra una lista de todas las variantes que tenían el porcentaje de inhibición mayor que 2 desviaciones típicas por encima de la media de todas las variantes sometidas a ensayo. La FIG. 21B muestra todas las variantes que tenían actividad significativa en cualquiera de los cuatro donantes. La mejor mutación puntual identificada fue T100V con un porcentaje de inhibición de 53 +/- 10%. La segunda mejor fue V95W con un promedio de 47%. La mejor variante fuera de la CDR3 de V_H fue R30 de V_L con dos sustituciones de aminoácidos variantes con un porcentaje medio de 23%.

Se crearon variantes de combinación basándose en los datos correspondientes a las variantes individuales. Se construyeron combinaciones que contenían cambios tanto en V_H como en V_L, incorporando en algunos casos las sustituciones en una V_L variante que tenía las sustituciones G28S y A34S en CDR-L1 (numeración de Kabat), correspondiente a la combinación G5 + A11S en CDR-L1 como se describe inicialmente en el documento WO 2010/121140. La cadena principal de V_L variante con las sustituciones G5 + A11S se denomina en la presente memoria VL-SS. Los anticuerpos variantes se expresaron y se purificaron y se sometieron a ensayo en el análisis de inhibición ADAbs, y en los análisis de afinidad de unión de TNF-α. Los resultados para determinar la unión de ADAbs se promediaron para más de 2 donantes. La unión se evaluó a través de las pruebas de resonancia de plasmón superficial (Biacore). Los resultados se muestran en la Figura 22. Las variantes Y32K/SS-R30T y Y32K/SS-R30I mostraron la mejor combinación de reducción de unión de ADA y conservaron la afinidad anti-TNF alfa.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.	
5	<120> METHODS FOR IDENTIFYING ANTIBODIES WITH REDUCED IMMUNOGENICITY	
	<130> 381493-721WO (118133)	
10	<140>	
	<141>	
	<150> 61/703,170	
	<151> 2012-09-19	
15	<160> 16	
	<170> PatentIn version 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 363	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
25	<223> /nota= "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"	
	<400> 1	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt ccggcaagct	120
	ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgg a atagtgg tca catagactat	180
	gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat	240
	ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg	300
	taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg	360
30	agt	363
	<210> 2	
	<211> 121	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"	
40	<400> 2	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
	20 25 30	

ES 2 621 285 T3

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

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

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgctc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatacactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

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

ES 2 621 285 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 5

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 6

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 7

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 621 285 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

5 <400> 8

	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Ala
	1				5					10	

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

15 <400> 9

	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser
	1				5		

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

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

25 <400> 10

	Gln	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ala	Pro	Tyr	Thr
	1				5				

<210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

35

<400> 11
 ctcgaaaata ataaagggaa aatcag

40

<210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

50

<400> 12
 tggtagtgtg gggactc

55

<210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 13
5 ttagttgtgc tgcacaggt tt 22

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 14
15 ggtcaccagt gttccctgac 20

<210> 15
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 15
gtaggcgaca gggcacaat 20

<210> 16
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 16
40 agtccgttg atctcgacct t 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de un anticuerpo anti-TNF- α de referencia o un fragmento de unión anti-TNF- α de referencia de un anticuerpo, cuyo anticuerpo o fragmento de unión de referencia comprende seis regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") que tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a los SEQ ID NO:5 (CDR-H1), SEQ ID NO:6 (CDR-H2), SEQ ID NO:7 (CDR-H3), SEQ ID NO:8 (CDR-L1), SEQ ID NO:9 (CDR-L2) y SEQ ID NO:10 (CDR-L3), en donde la variante comprende la sustitución Y2K in CDR-H1, en donde las seis CDR juntas tienen hasta 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de CDR del anticuerpo de referencia o fragmento original.
- 10 2. La variante de la reivindicación 1, en donde la variante comprende adicionalmente al menos una de las sustituciones en la cadena pesada (i) T6V en CDR-H3, y (ii) V1G en CDR-H3 y T6V en CDR-H3.
- 15 3. La variante de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la variante comprende adicionalmente al menos una de las sustituciones en la cadena ligera (i) G5S en CDR-L1 y A11S en CDR-L1, (ii) R7I en CDR-L1, (iii) G5S en CDR-L1, R7T en CDR-L1 y A11S en CDR-L1, y (iv) G5S en CDR-L1, R7I en CDR-L1 y A11S en CDR-L1.
- 20 4. La variante de la reivindicación 1, en donde la variante comprende adicionalmente al menos una de las sustituciones en la cadena ligera (i) R7I en CDR-L1 y (ii) R7T en CDR-L1.
- 25 5. La variante de la reivindicación 1, en donde la variante comprende adicionalmente al menos una de las sustituciones en la cadena ligera (i) G5S en CDR-L1, R7T en CDR-L1 y A11S en CDR-L1 y (ii) G5S en CDR-L1, R7I en CDR-L1 y A11S en CDR-L1.
- 30 6. La variante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-TNF- α de referencia o el fragmento de unión anti-TNF- α de referencia comprende un fragmento de cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde al SEQ ID NO:2 y un fragmento de cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde al SEQ ID NO:4.
- 35 7. Una molécula de ácido nucleico que codifica la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Una célula anfitriona que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40 9. Una composición que comprende la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Una variante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno inmunitario en un paciente humano, en donde el método comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de la variante.
- 45 11. La variante para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el trastorno inmunitario se selecciona entre artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis en placas y espondiloartritis axial.

D2E7(Adalimumab, HUMIRA) V_H (SEQ ID NO:2)

EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFD**DYAMH**WVRQAPGKGLEWVS**AITWNSGHIDYADSVEGR**
FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**VSYLSTASSLDY**WGQGTLLTVSS

D2E7 (Adalimumab, HUMIRA) V_L (SEQ ID NO:4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGIRNYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**AASTLQS**GVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDVATYYC**QRYNRAPYT**FGQGTKVEIK

FIG. 1A

Cadena de Anticuerpo	Núm. de CDR	Secuencia	SEQ ID NO.
Pesada	1	DYAMH	5
Pesada	2	AITWNSGHIDYADSVEG	6
Pesada	3	VSYLSTASSLDY	7
Ligera	1	RASQGIRNYLA	8
Ligera	2	AASTLQS	9
Ligera	3	QRYNRAPYT	10

FIG. 1B

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT	120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT	180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT	240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG	300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG	360
AGT	363

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable de D2E7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC	60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA	120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT	180
CGGTTCAAGT GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT	240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG	300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A	321

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable de D2E7

FIG. 1C

posición	kabat	aminoácido WT	mutaciones beneficiosas en V _L
L1-1	24	R	
L1-2	25	A	
L1-3	26	S	
L1-4	27	Q	
L1-5	28	G	F ^{ab} , I ^{ab} , V ^b , W ^{bc} , Y ^{ab}
L1-6	29	I	
L1-7	30	R	I ^{ab} , T ^{abc} , V ^{abc}
L1-8	31	N	A ^{abc} , D ^{ac} , E ^{ac} , G ^{abc} , L ^{abc} , M ^{abc} , Q ^{abc} , R ^{abc} , T ^{abc}
L1-9	32	Y	
L1-10	33	L	
L1-11	34	A	
L2-1	50	A	I ^{bc} , T ^{bc} , V ^{abc}
L2-2	51	A	
L2-3	52	S	
L2-4	53	T	D ^{bc}
L2-5	54	L	
L2-6	55	Q	
L2-7	56	S	
L3-1	89	Q	
L3-2	90	R	G ^a
L3-3	91	Y	
L3-4	92	N	F ^{abc} , M ^{ab} , W ^{abc} , Y ^c
L3-5	93	R	L ^a , N ^a , W ^{ab} , Y ^a
L3-6	94	A	
L3-7	95	P	
L3-8	96	Y	
L3-9	97	T	Y ^c

FIG. 2

posición	kabat	aminoácido WT	mutaciones beneficiosas en V _H
H1-1	31	D	S ^d
H1-2	32	Y	A ^d , C ^d , K ^d , M ^d , R ^d , S ^d , V ^d
H1-3	33	A	
H1-4	34	M	
H1-5	35	H	C ^d , D ^d , E ^d , S ^d , T ^d
H2-1	50	A	
H2-2	51	I	
H2-3	52	T	A ^d , G ^d , N ^d
H2-4	52a	W	A ^d , F ^d , H ^d , L ^d , M ^d , V ^d
H2-5	53	N	G ^e
H2-6	54	S	D ^e , L ^e
H2-7	55	G	
H2-8	56	H	
H2-9	57	I	K ^{ef}
H2-10	58	D	L ^d
H2-11	59	Y	A ^{ef} , C ^{ef} , E ^{ef} , F ^{ef} , G ^{ef} , H ^{ef} , I ^{ef} , K ^{ef} , L ^{ef} , M ^e , N ^{ef} , Q ^e , R ^{ef} , S ^{ef} , V ^{ef} , W ^{ef} ,
H2-12	60	A	Y ^e
H2-13	61	D	N ^f
H2-14	62	S	
H2-15	63	V	D ^{ef} , L ^{ef} , M ^{ef} , Q ^{ef} , T ^{ef}
H2-16	64	E	F ^{ef} , H ^e , K ^{ef} , R ^{ef} , T ^{ef} , W ^{ef}
H2-17	65	G	A ^{ef} , C ^{ef} , E ^{ef} , H ^e , I ^{ef} , K ^{ef} , L ^{ef} , M ^{ef} , N ^{ef} , P ^{ef} , Q ^{ef} , R ^{ef} , S ^{ef} , T ^{ef} , Y ^{ef}

FIG. 3A

posición	kabat	aminoácido WT	mutaciones beneficiosas en V_H
H3-1	95	V	G ^d , R ^d , W ^d
H3-2	96	S	
H3-3	97	Y	
H3-4	98	L	T ^d , V ^d
H3-5	99	S	
H3-6	100	T	V ^d
H3-7	100a	A	
H3-8	100b	S	
H3-9	100c	S	K ^d , W ^e , Y ^e
H3-10	100d	L	
H3-11	101	D	V ^d
H3-12	102	Y	

FIG. 3B

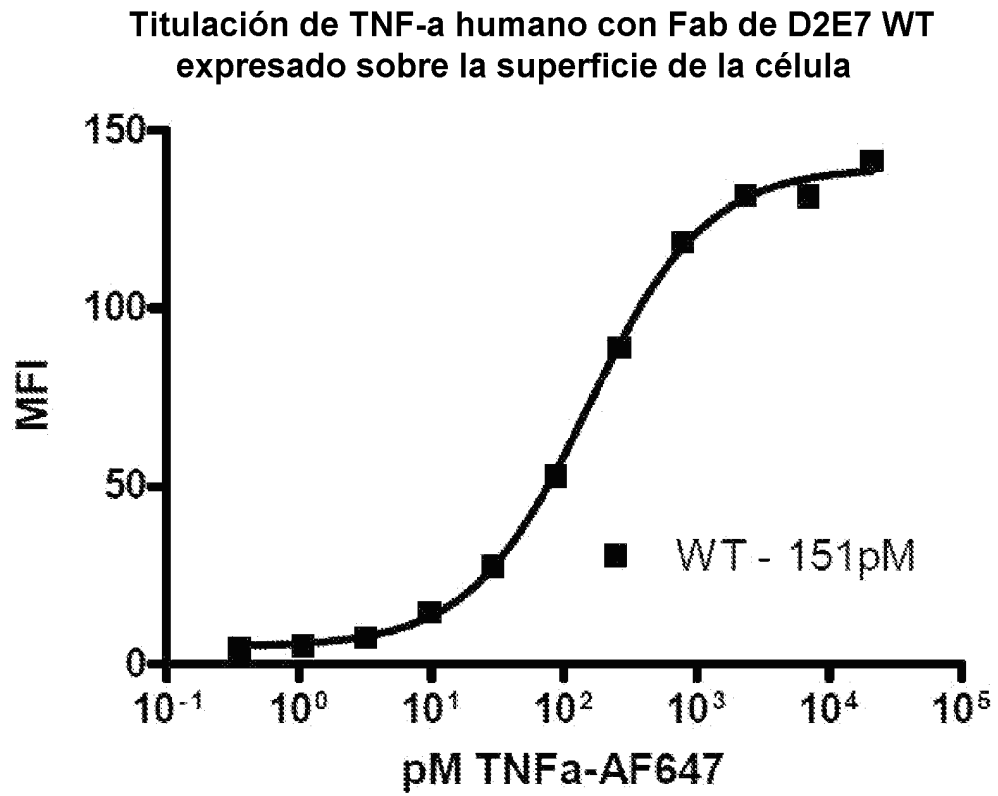


FIG. 5

unión de anti-idiotipo a Fab de D2E7 WT
expresado en la superficie de la célula

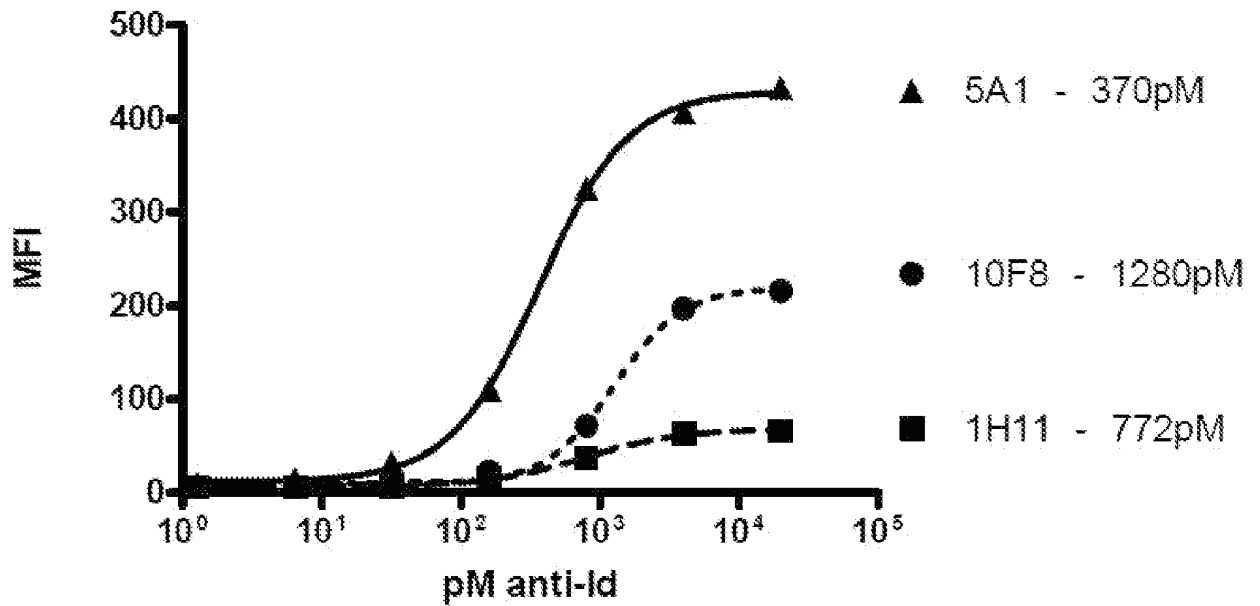


FIG. 6

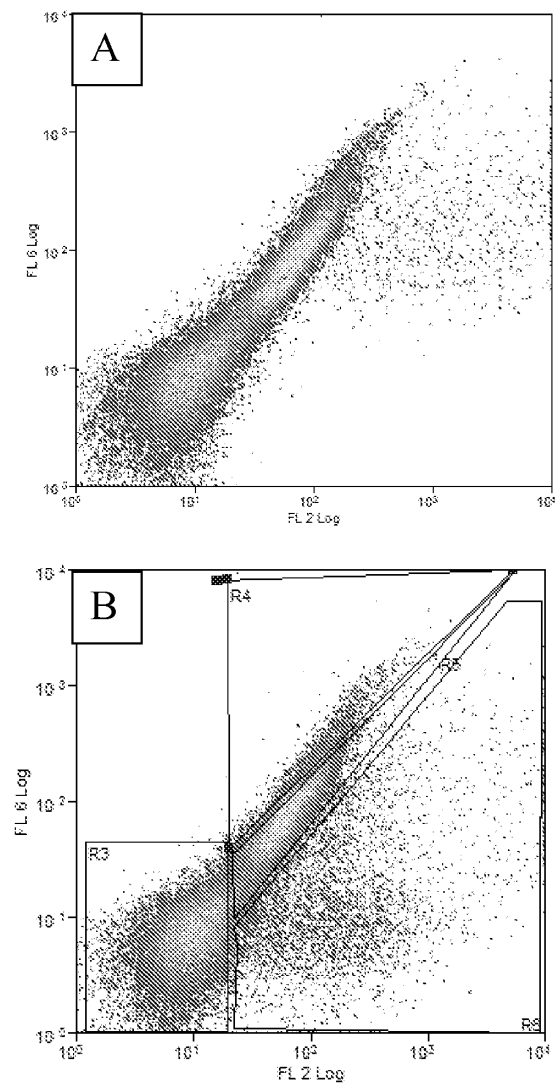


FIG. 7

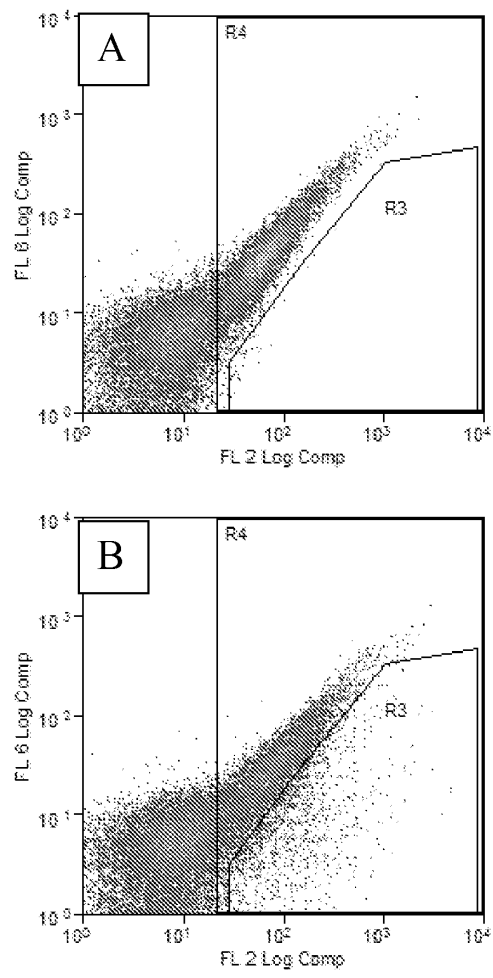


FIG. 8

AA WT	WT	AA	Mutante	CDR	posición		ER 1H11	ER TNF- α
D	GAC	D	GAT	CDR-H1	1		0,29	1,47
A	GCC	A	GCG	CDR-H1	3		0,06	1,64
A	GCC	A	GCT	CDR-H1	3		0,4	1,33
H	CAC	H	CAT	CDR-H1	5		0,14	1,46
A	GCG	A	GCT	CDR-H2	1		0,3	1,08
I	ATC	I	ATT	CDR-H2	2		0,08	1,23
T	ACG	T	ACT	CDR-H2	3		0,44	1,36
N	AAC	N	AAT	CDR-H2	5		0,27	1,63
G	GGC	G	GGG	CDR-H2	7		0,16	1,46
G	GGC	G	GGT	CDR-H2	7		0,07	1,27
H	CAC	H	CAT	CDR-H2	8		0,19	1,38
I	ATA	I	ATT	CDR-H2	9		0,01	1,85
A	GCA	A	GCT	CDR-H2	12		0,02	1,47
A	GCA	A	GCG	CDR-H2	12		0,02	1,11
S	AGC	S	TCT	CDR-H2	14		0,01	1,57
S	AGC	S	TCG	CDR-H2	14		0	1,58
S	AGC	S	AGT	CDR-H2	14		0,07	1,14
V	GTG	V	GTT	CDR-H2	15		0,04	1,52
E	GAA	E	GAG	CDR-H2	16		0,13	1,72
G	GGA	G	GGT	CDR-H2	17		0,02	1,29
G	GGA	G	GGG	CDR-H2	17		0,02	1,44
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	2		0,12	1,27
L	CTC	L	CTT	CDR-H3	4		0,07	1,43
L	CTC	L	TTG	CDR-H3	4		0,02	1,43
L	CTC	L	CTG	CDR-H3	4		0,02	1,50
S	TCA	S	TCG	CDR-H3	5		0,2	1,45
S	TCA	S	TCT	CDR-H3	5		0,01	1,40
S	TCA	S	AGT	CDR-H3	5		0,04	1,39
T	ACA	T	ACT	CDR-H3	6		0,08	1,14
A	GCT	A	GCG	CDR-H3	7		0,27	1,22
S	TCC	S	AGT	CDR-H3	8		0	1,53
S	TCC	S	TCG	CDR-H3	8		0,02	1,53
S	TCC	S	TCT	CDR-H3	8		0,46	0,92
S	AGC	S	TCG	CDR-H3	9		0	1,63
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	9		0,14	1,19
L	CTA	L	TTG	CDR-H3	10		0	1,34
Y	TAC	Y	TAT	CDR-H3	12		0,34	1,34

	1H11	TNF- α	Unión neutra a TNF- α
media	0,12	1,40	1.21-1.59
DT	0,13	0,19	

FIG. 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	VL CDR1-1 R24	VL CDR1-9 Y32	VL CDR2-6 Q55	VL CDR3-7 P95	VH CDR2-1 A50	VH CDR2-9 I57	VH CDR2-17 G65	VH CDR3-8 S100b
B	VL CDR1-2 A25	VL CDR1-10 L33	VL CDR2-7 S56	VL CDR3-8 Y96	VH CDR2-2 I51	VH CDR2-10 D58	VH CDR3-1 V95	VH CDR3-9 S100c
C	VL CDR1-3 S26	VL CDR1-11 A34	VL CDR3-1 Q89	VL CDR3-9 T97	VH CDR2-3 T52	VH CDR2-11 Y59	VH CDR3-2 S96	VH CDR3-10 L100d
D	VL CDR1-4 Q27	VL CDR2-1 A50	VL CDR3-2 R90	VH CDR1-1 D31	VH CDR2-4 W52a	VH CDR2-12 A60	VH CDR3-3 Y97	VH CDR3-11 D101
E	VL CDR1-5 G28	VL CDR2-2 A51	VL CDR3-3 Y91	VH CDR1-2 Y32	VH CDR2-5 N53	VH CDR2-13 D61	VH CDR3-4 L98	VH CDR3-12 Y102
F	VL CDR1-6 I29	VL CDR2-3 S52	VL CDR3-4 N92	VH CDR1-3 A33	VH CDR2-6 S54	VH CDR2-14 S62	VH CDR3-5 S99	
G	VL CDR1-7 R30	VL CDR2-4 T53	VL CDR3-5 R93	VH CDR1-4 M34	VH CDR2-7 G55	VH CDR2-15 V63	VH CDR3-6 T100	
H	VL CDR1-8 N31	VL CDR2-5 L54	VL CDR3-6 A94	VH CDR1-5 H35	VH CDR2-8 H56	VH CDR2-16 E64	VH CDR3-7 A100a	

FIG. 10

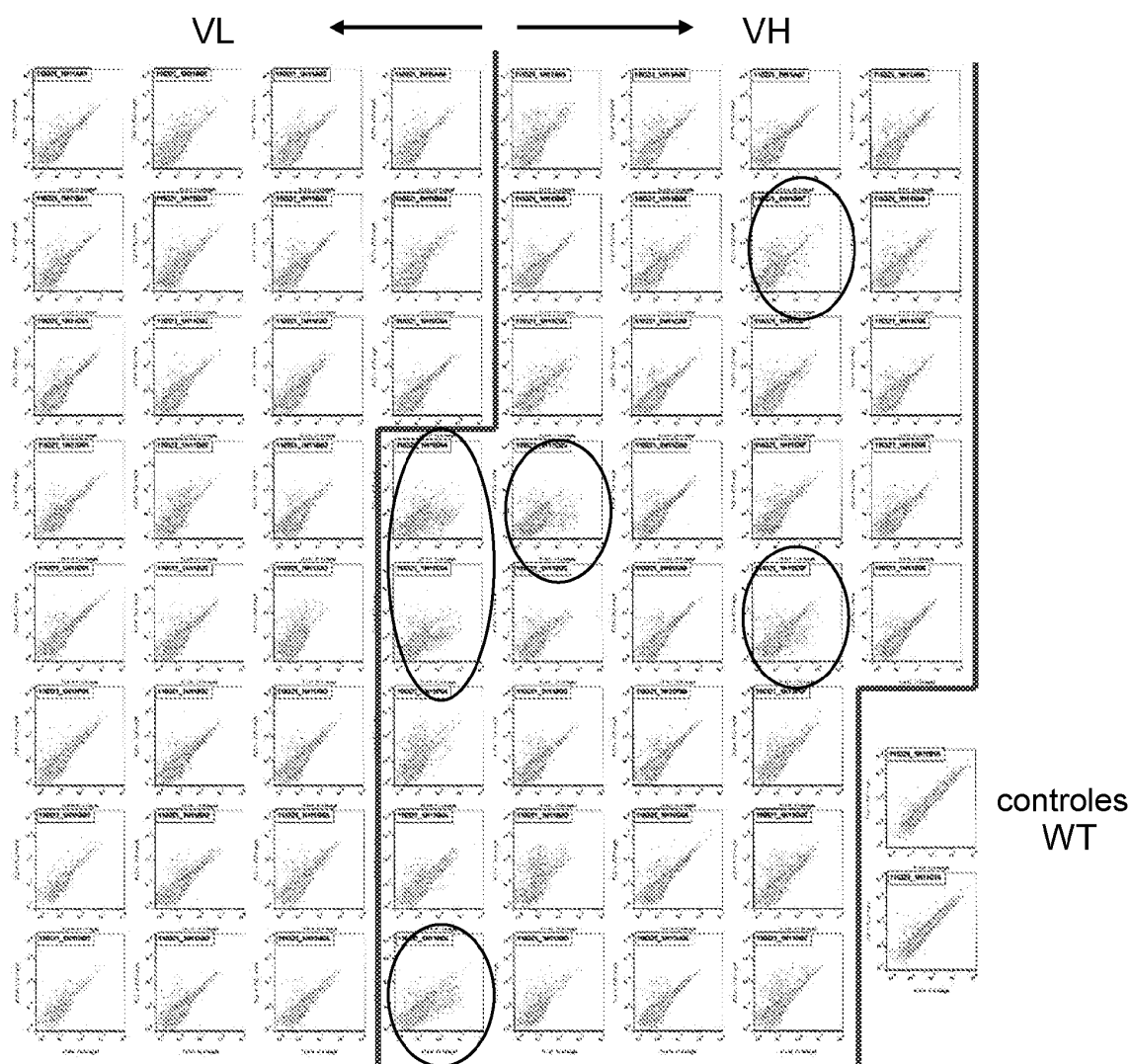


FIG. 11

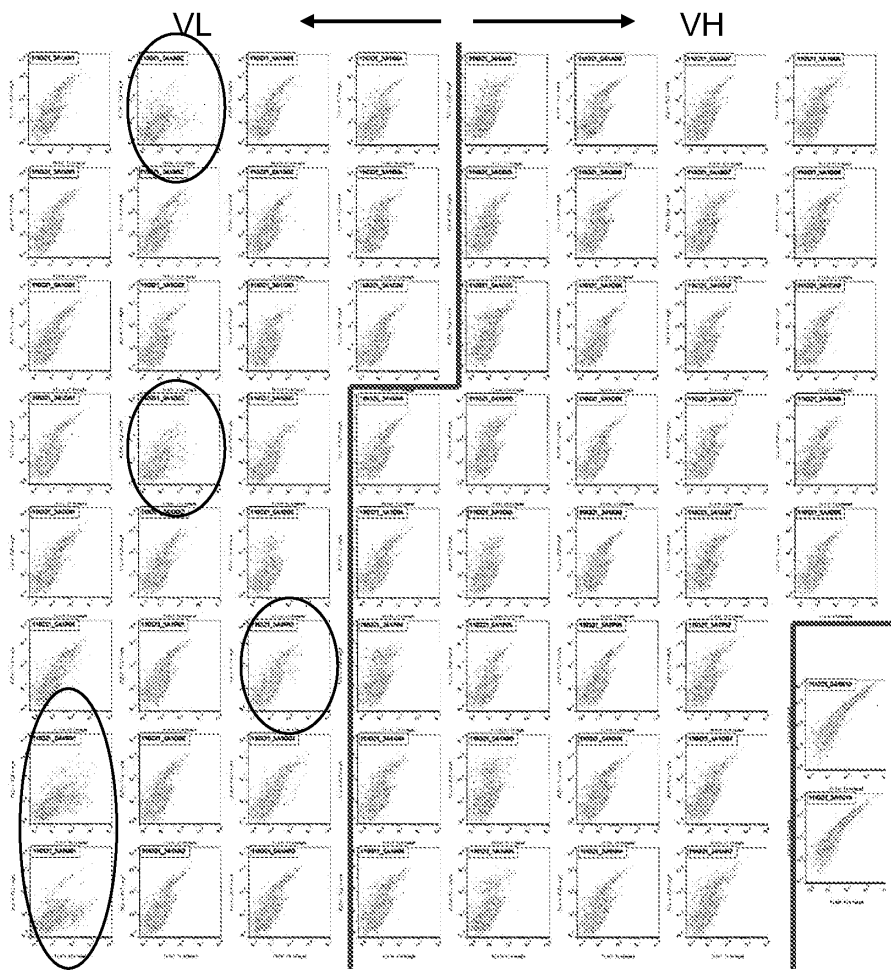


FIG. 12

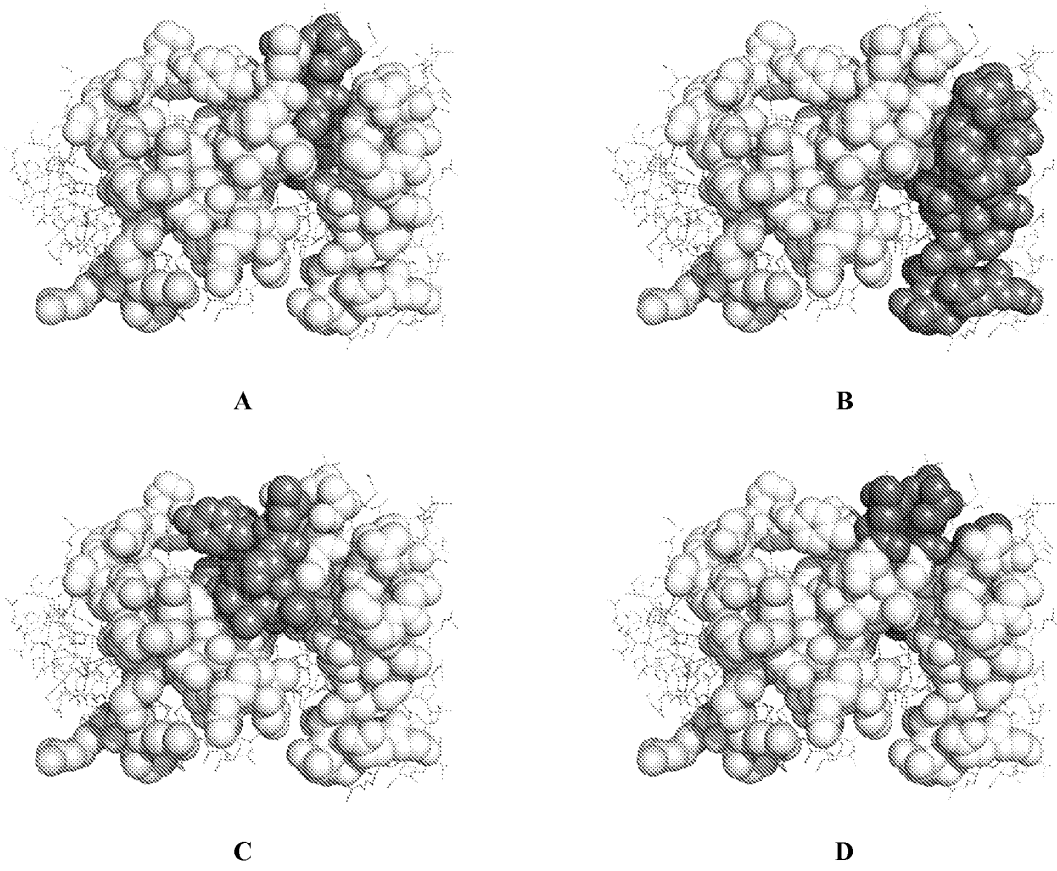


FIG. 13A-D

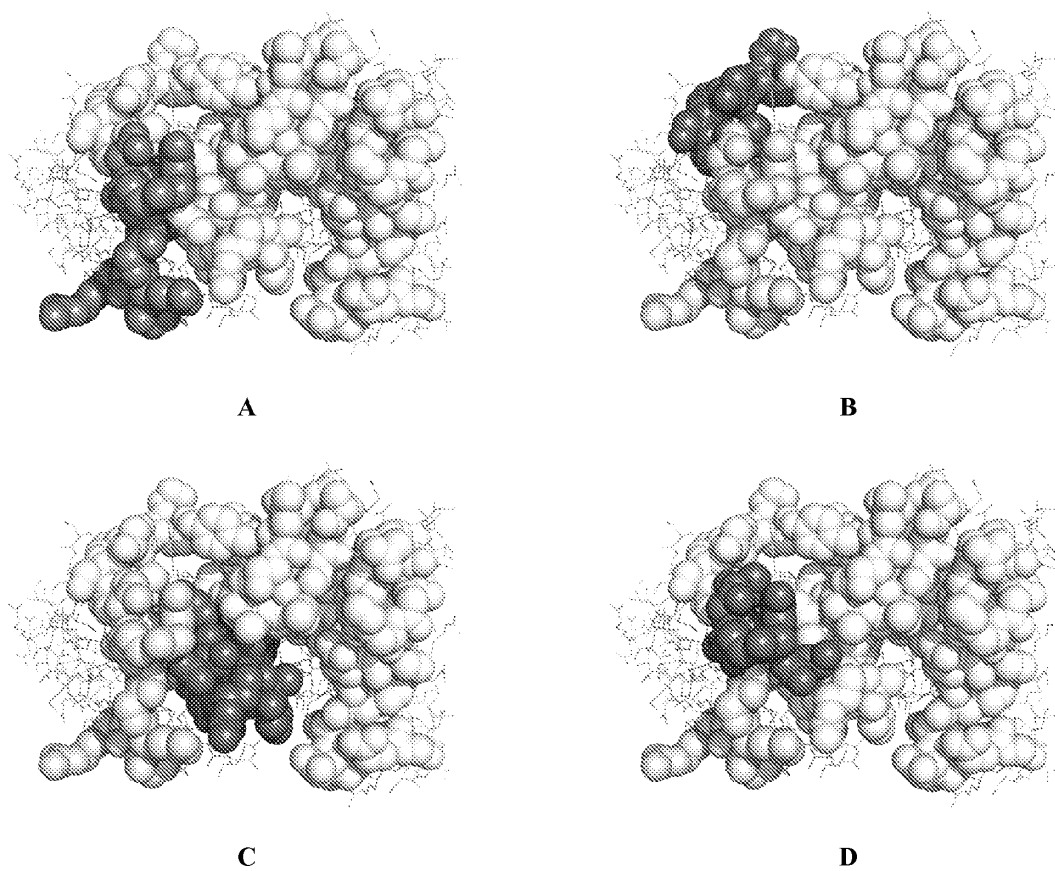
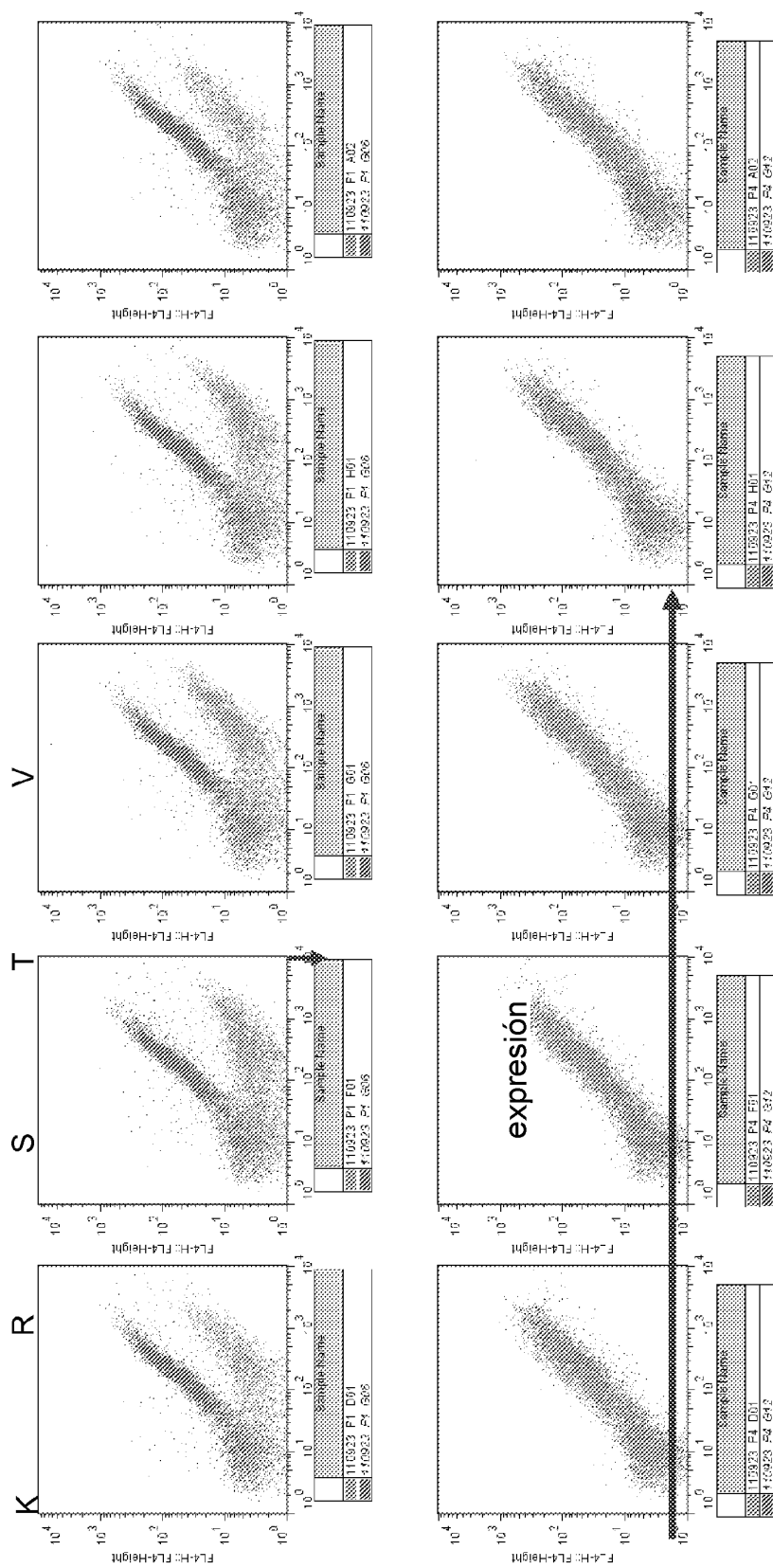


FIG. 14A-D



AA	CDR	posición	ER de 1H11	ER media de 1H11 en la posición	ER de TNF α
A	CDR-H1	2	5,22	5,69	1,37
A	CDR-H1	2	6,21	5,69	1,32
C	CDR-H1	2	11,17	5,69	1,22
D	CDR-H1	2	0,56	5,69	0,03
E	CDR-H1	2	0,44	5,69	0,00
F	CDR-H1	2	0,03	5,69	1,32
G	CDR-H1	2	6,95	5,69	0,39
G	CDR-H1	2	5,42	5,69	0,25
H	CDR-H1	2	3,58	5,69	1,14
I	CDR-H1	2	6,80	5,69	1,20
K	CDR-H1	2	9,58	5,69	1,47
L	CDR-H1	2	1,44	5,69	0,95
L	CDR-H1	2	1,40	5,69	0,91
L	CDR-H1	2	1,29	5,69	0,64
M	CDR-H1	2	4,37	5,69	1,25
N	CDR-H1	2	8,40	5,69	1,60
P	CDR-H1	2	1,22	5,69	0,38
P	CDR-H1	2	1,03	5,69	0,33
Q	CDR-H1	2	9,41	5,69	1,18
R	CDR-H1	2	8,02	5,69	1,65
R	CDR-H1	2	6,88	5,69	1,46
R	CDR-H1	2	10,28	5,69	1,45
S	CDR-H1	2	7,32	5,69	1,65
S	CDR-H1	2	9,20	5,69	1,44
S	CDR-H1	2	6,28	5,69	1,28
T	CDR-H1	2	9,51	5,69	1,2
T	CDR-H1	2	6,48	5,69	1,14
V	CDR-H1	2	9,34	5,69	1,41
V	CDR-H1	2	6,44	5,69	1,28
W	CDR-H1	2	6,50	5,69	1,19

unión de WT a TNF α : 1,21 – 1,60

unión de WT a 1H11: 0,00 – 0,25

FIG. 16

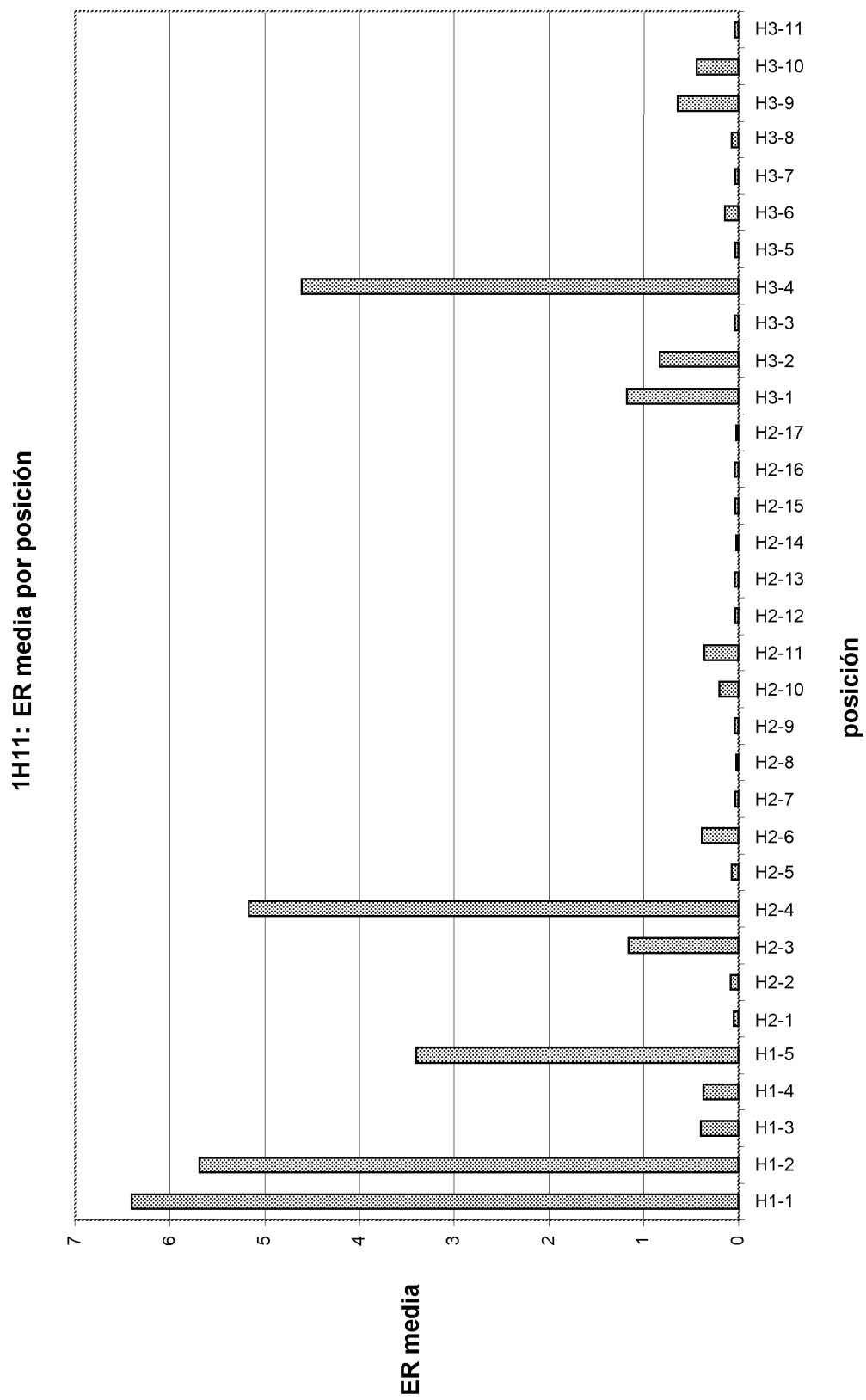


FIG. 17

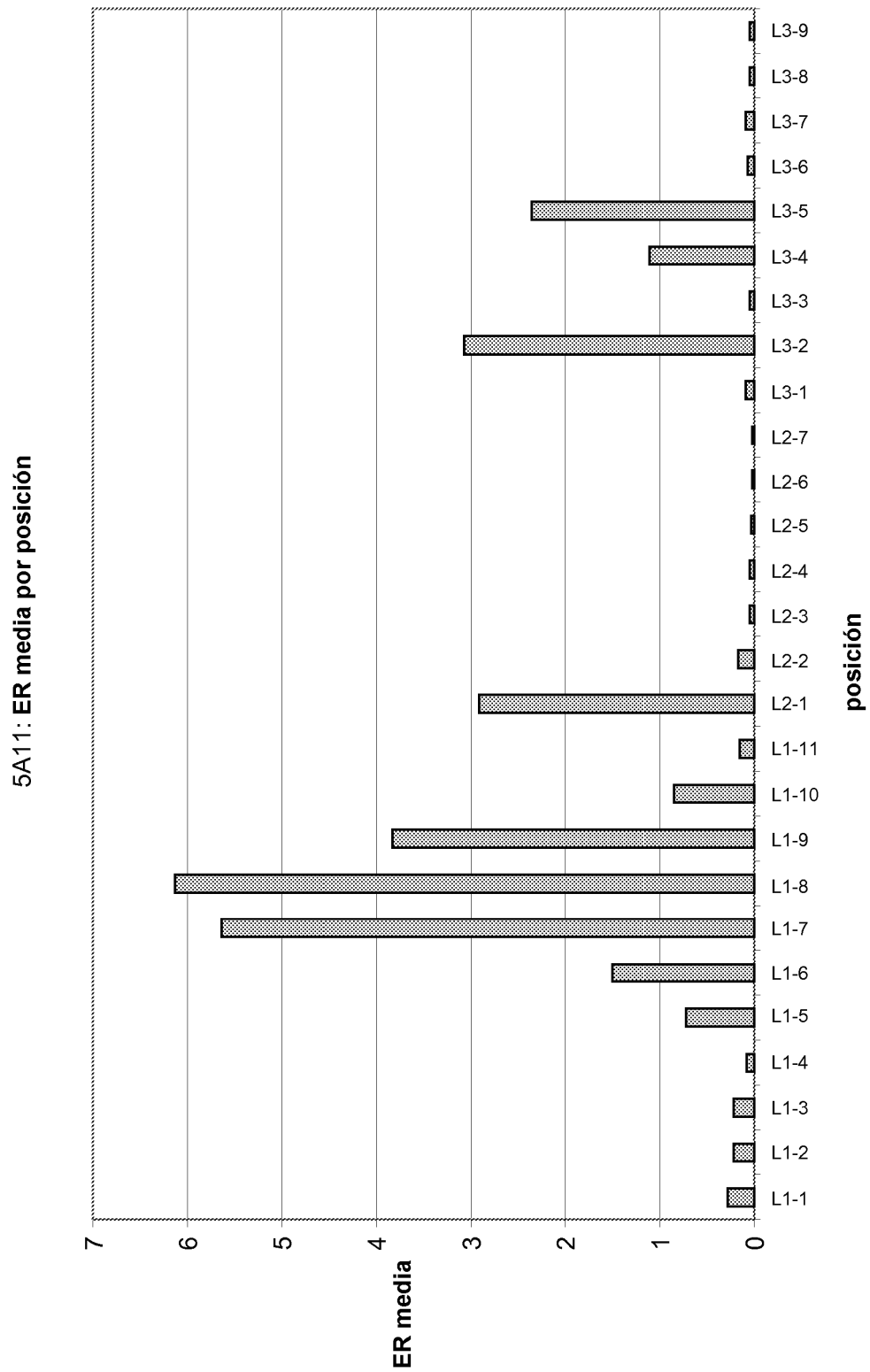


FIG. 18

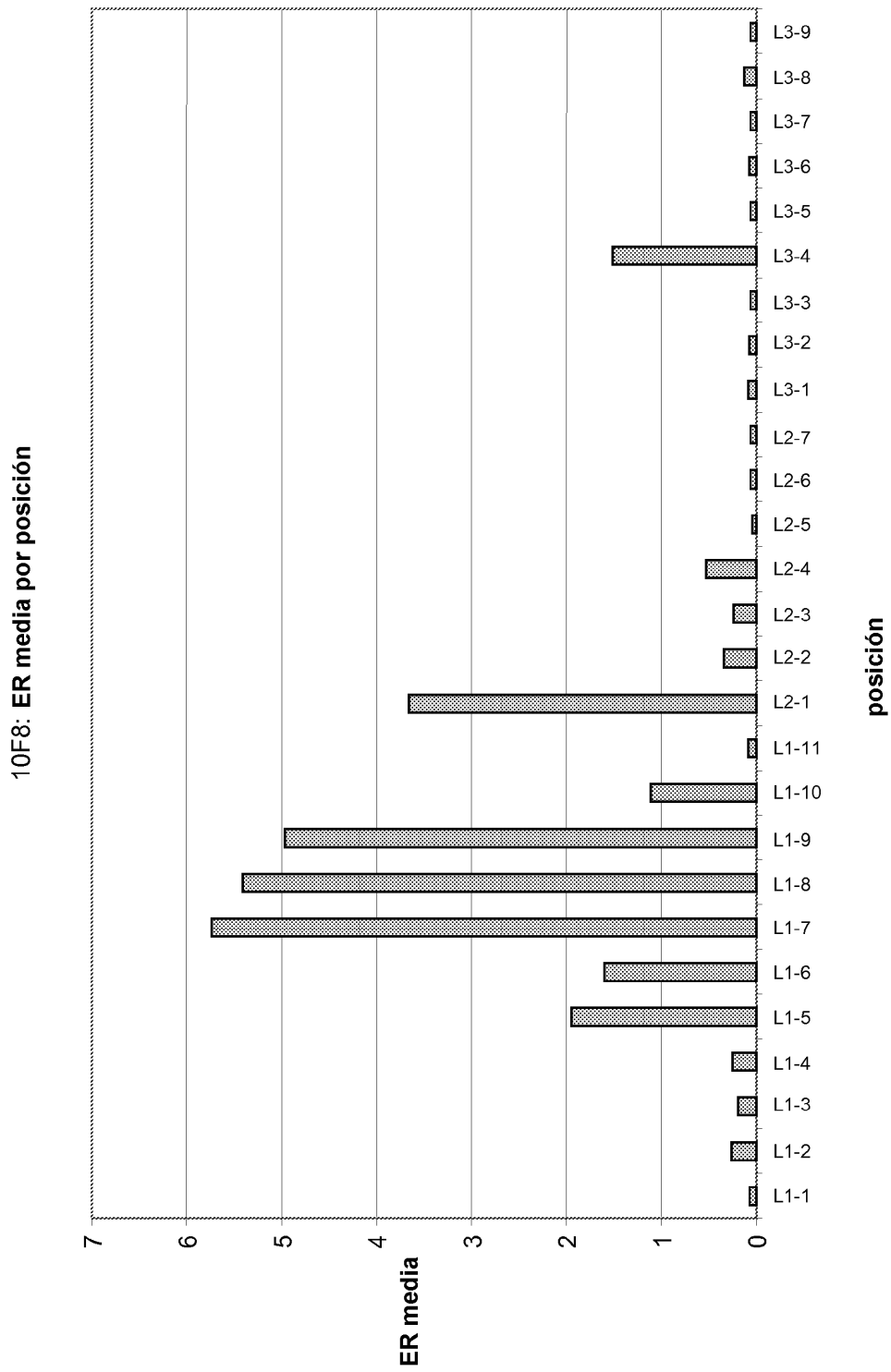


FIG. 19

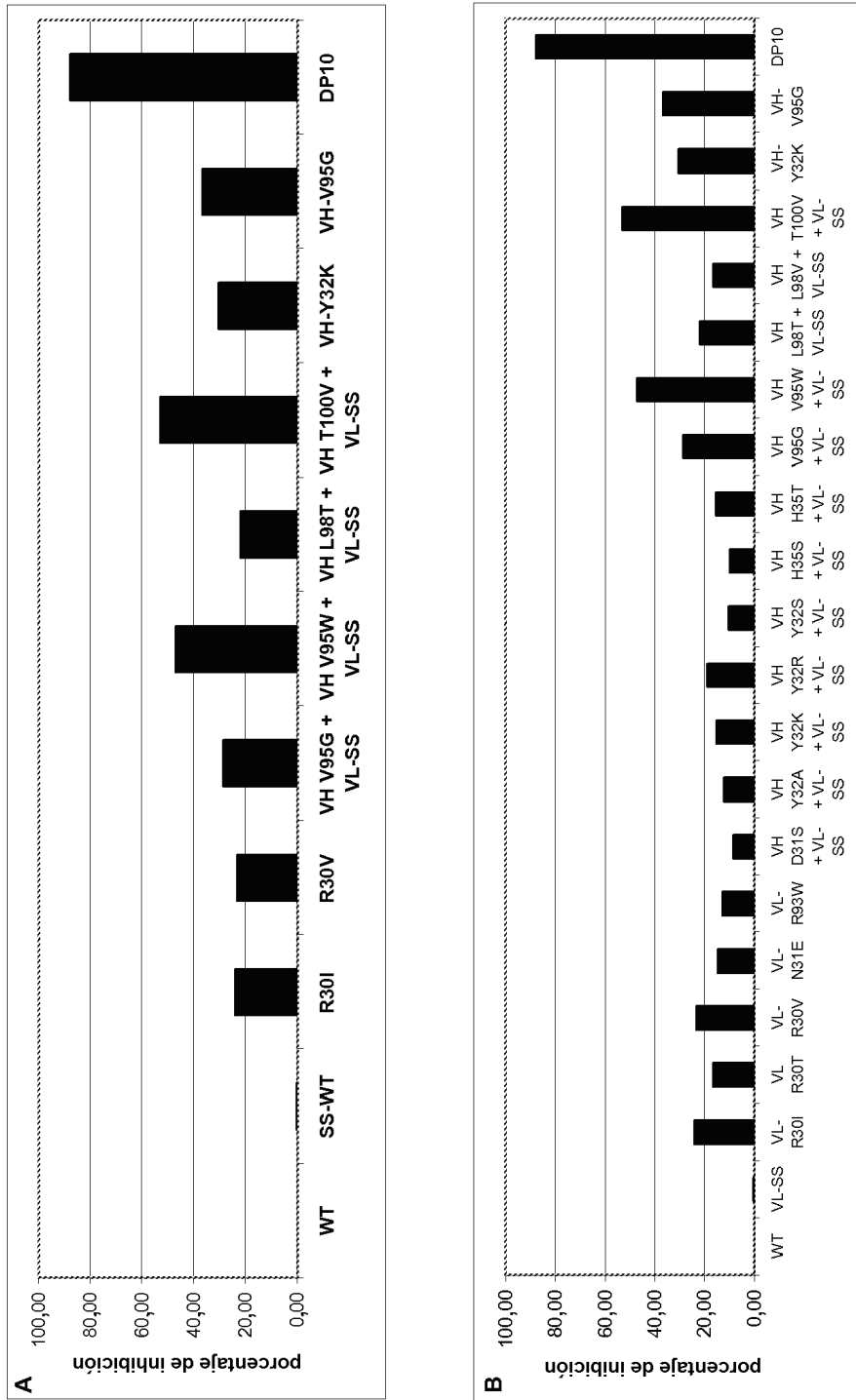
ES 2 621 285 T3

Variante	Notación	37440	23709	90814	84111	Media	DT
WT	WT	1,67	-1,16	0,00	-0,44	0,02	1,20
VL-SS	VL-SS	-2,90	3,79	0,35	-0,33	0,23	2,76
VL R30T	VL4	8,44	26,36	18,92	11,19	16,23	8,08
VH Y59I + VL-SS	VH16-SS	0,13	1,60	-0,66	-0,46	0,15	1,02
VH Y59R + VL-SS	VH20-SS	-1,23	2,82	-1,08	1,24	0,44	1,95
VH V63D + VL-SS	VH24-SS	-0,77	-0,37	-0,69	-0,54	-0,59	0,18
VL G28F	VL1	3,15	15,50	0,69	0,22	4,89	7,19
VL G28V	VL2	-5,29	10,13	-0,71	-0,07	1,01	6,51
VL G28Y	VL3	-1,46	8,33	-0,16	0,00	1,68	4,48
VL N31D	VL5	-0,46	13,13	0,56	1,32	3,64	6,37
VL N31L	VL6	3,77	10,88	1,19	1,68	4,38	4,48
VL N31T	VL7	3,43	8,70	1,04	0,88	3,51	3,65
VL A50T	VL9	1,77	15,45	0,01	-0,19	4,26	7,51
VL T53D	VL10	0,00	3,77	-1,25	-0,50	0,51	2,24
VL N92F	VL11	5,96	24,50	4,50	4,41	9,85	9,80
VL N92Y	VL12	7,62	22,66	6,17	6,19	10,66	8,03
VL R93L	VL13	2,14	17,92	1,19	1,92	5,79	8,09
VL R93N	VL14	1,79	15,93	1,22	1,48	5,10	7,22
VH D31S + VL-SS	VH1-SS	3,20	25,37	2,20	1,63	8,10	11,53
VH Y32A + VL-SS	VH2-SS	8,88	31,91	4,01	2,69	11,87	13,62
VH Y32R + VL-SS	VH3-SS	11,81	52,68	5,85	3,80	18,54	23,02
VH Y32S + VL-SS	VH4-SS	7,34	25,95	4,08	2,21	9,90	10,91
VH H35E + VL-SS	VH6-SS	0,99	20,58	0,07	0,23	5,47	10,08
VH H35T + VL-SS	VH7-SS	14,67	33,27	2,20	10,15	15,07	13,18
VH T52A + VL-SS	VH8-SS	-1,98	18,61	0,64	0,86	4,53	9,48
VH T52G + VL-SS	VH9-SS	2,32	24,96	1,61	1,36	7,56	11,60
VH I57K + VL-SS	VH10-SS	-2,69	8,43	-1,23	-0,42	1,02	5,03
VH Y59A + VL-SS	VH12-SS	-2,32	4,80	-1,31	-1,09	0,02	3,23
VH Y59C + VL-SS	VH13-SS	-4,39	4,37	-1,01	-0,49	-0,38	3,61
VH Y59F + VL-SS	VH14-SS	-1,51	7,70	-0,01	-0,23	1,49	4,19
VH Y59H + VL-SS	VH15-SS	-0,38	6,28	-0,49	-0,04	1,34	3,30
VH Y59L + VL-SS	VH18-SS	-0,74	5,37	-1,39	-0,48	0,69	3,14
VH Y59M + VL-SS	VH19-SS	0,58	2,92	-1,25	-0,53	0,43	1,82
VH Y59S + VL-SS	VH21-SS	-2,89	6,58	-1,41	-1,08	0,30	4,26
VH Y59V + VL-SS	VH22-SS	-1,52	4,05	-1,24	0,20	0,37	2,56
VH Y59W + VL-SS	VH23-SS	-1,16	8,76	1,03	-0,24	2,10	4,53
VH V63L + VL-SS	VH25-SS	-0,41	7,11	-0,45	-0,10	1,54	3,72
VH G65A + VL-SS	VH26-SS	-2,74	6,44	-1,32	-0,31	0,52	4,07
VH G65E + VL-SS	VH27-SS	-2,55	8,87	-0,38	-0,46	1,37	5,10
VH G65L + VL-SS	VH28-SS	-2,94	1,80	-1,25	-1,10	-0,88	1,97
VH G65M + VL-SS	VH29-SS	-2,30	3,73	-0,30	-1,12	0,00	2,62
VH G65Q + VL-SS	VH30-SS	-1,54	5,57	1,01	-0,46	1,14	3,13
VH G65R + VL-SS	VH31-SS	3,27	7,88	-0,47	-0,14	2,63	3,88

Fig. 20A

Variante	Notación	37440	23709	90814	84111	Media	DT
VH G65S + VL-SS	VH32-SS	-1,77	5,59	-1,30	-0,46	0,51	3,43
VH V95R + VL-SS	VH33-SS	-1,47	9,95	-0,32	0,35	2,13	5,27
VH V95W + VL-SS	VH34-SS	26,86	59,72	63,70	37,73	47,00	17,63
VH L98T + VL-SS	VH35-SS	22,01	43,07	13,08	8,65	21,70	15,29
VH L98V + VL-SS	VH36-SS	9,75	45,57	6,23	3,32	16,22	19,75
VH T100V + VL-SS	VH37-SS	47,11	61,75	60,87	42,04	52,94	9,89
VH D101V + VL-SS	VH38-SS	0,93	13,57	-0,32	0,55	3,68	6,61
VH Y32K + VL-SS	VH39-SS	13,28	35,32	6,92	4,34	14,97	14,08
VH Y32V + VL-SS	VH40-SS	7,07	19,62	2,17	1,36	7,56	8,43
VH H35C + VL-SS	VH41-SS	2,04	24,36	0,94	0,77	7,03	11,57
VH H35S + VL-SS	VH42-SS	3,09	30,19	4,08	1,16	9,63	13,76
VH V95G + VL-SS	VH43-SS	29,10	53,62	18,01	13,00	28,43	18,09
G28I		5,05	15,84		-0,10	6,93	8,14
G28W		3,54	14,89		-0,05	6,13	7,80
R30I		18,99	44,28		8,46	23,91	18,41
R30V		19,04	40,09		10,16	23,10	15,37
N31E		10,69	29,20		3,37	14,42	13,31
N31G		6,16	19,35		1,03	8,85	9,45
V31R		5,80	13,38		0,78	6,65	6,35
A50V		2,15	15,98		-0,01	6,04	8,68
R93W		6,25	28,88		2,34	12,49	14,33
VH-Y32K		36,31	24,20			30,26	8,56
VH-Y32V		21,20	13,50			17,35	5,44
VH-H35C		12,70	19,40			16,05	4,74
VH-H35S		13,99	22,56			18,28	6,06
VH-V95G		34,70	38,58			36,64	2,75
DP10		99,82	84,18	95,33	71,54	87,72	12,63

Fig. 20B



FIGS. 21A-21B

VH	VL	formación de puentes ADAb	multiplicidad de afinidad	afinidad pM
WT	WT	5	100	83 +/- 10
WT	SS	0.4	82	150
Y32K/T100V	SS	28	142	61
Y32K/V95G/T100V	SS	24	122	71
Y32K	SS/R30T	45	55	130
Y32K	SS/R30I	48	50	149
V95G/T100V	SS	15	25	335
Y32M	SS	0	21	411
V95W	R30I	95	23	379
V95W	R30T	97	0	>10.000

FIG. 22