

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 613**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2011** **PCT/CH2011/000256**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012** **WO12051734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011** **E 11776322 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017** **EP 2630159**

54 Título: **Anticuerpos estables y solubles**

30 Prioridad:

22.10.2010 US 405798 P

11.05.2011 US 201161405798 P

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

23.03.2018

73 Titular/es:

ESBATECH - A NOVARTIS COMPANY LLC
(100.0%)

Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

BORRAS, LEONARDO y
URECH, DAVID

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 660 613 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

Anticuerpos estables y solubles

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para reducir la propensión a la agregación de los anticuerpos y a anticuerpos que se modifican para reducir la propensión a la agregación. La invención también se refiere a anticuerpos que se unen al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). En particular, la invención se refiere a anticuerpos estables y solubles que comprenden una modificación reductora de la agregación, incluyendo anticuerpos scFv y fragmentos Fab, que comprenden secuencias específicas de cadena ligera y cadena pesada que se optimizan conferirles estabilidad, solubilidad y baja inmunogenicidad. Además, la invención se refiere a métodos para el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos mediados por TNF.

Antecedentes de la invención

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , también conocido como caquectina), es una citocina de mamífero de origen natural producida por diversos tipos celulares, incluyendo monocitos y macrófagos en respuesta a endotoxinas u otros estímulos. TNF α es un mediador principal de las reacciones inflamatorias, inmunológicas y patofisiológicas (Grell, M., et al. (1995), Cell, 83: 793-802).

El TNF α soluble se forma por la escisión de una proteína transmembrana precursora (Kriegler, et al. (1988) Cell 53: 45-53) y los polipéptidos de 17 kDa secretados se ensamblan formando complejos de homotrímero solubles (Smith, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 6951-6954; para una revisión del TNF α , véase Butler et al. (1986), Nature 320:584; Old (1986), Science 230:630). Después, estos complejos entonces se unen a receptores encontrados en una diversidad de células. La unión produce una serie de efectos proinflamatorios, incluyendo (i) liberación de otras citocinas proinflamatorias tales como interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-1, (ii) liberación de metaloproteinasas de matriz y (iii) regulación positiva de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, amplificando adicionalmente la cascada inflamatoria e inmunitaria mediante la atracción de leucocitos a tejidos extravasculares.

Un gran número de trastornos está asociado con niveles elevados de TNF α , muchos de ellos con una importancia médica significativa. Se ha demostrado que el TNF α está regulado positivamente en una serie de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades crónicas tales como artritis reumatoide (RA), trastornos inflamatorios del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, septicemia, insuficiencia cardíaca congestiva, asma bronquial y esclerosis múltiple. Los ratones transgénicos para TNF α humano producen de manera constitutiva altos niveles de TNF α y desarrollan una poliartritis destructiva espontánea que se asemeja a la RA (Keffer et al., 1991, EMBO J., 10, 4025-4031). Por lo tanto, el TNF α se cita como una citocina proinflamatoria.

Actualmente se reconoce al TNF α como un factor clave en la patogénesis de la RA, que es una enfermedad crónica, progresiva y debilitante caracterizada por inflamación y destrucción de articulaciones poliarticulares, con síntomas sistémicos de fiebre o malestar y fatiga. La RA también da lugar a inflamación sinovial crónica, con un progreso frecuente hacia la destrucción del cartílago y el hueso articular. Se encuentran niveles aumentados de TNF α tanto en el fluido sinovial como en la sangre periférica de los pacientes que padecen RA. Cuando se administran agentes bloqueantes de TNF α a los pacientes que padecen RA, reducen la inflamación, mejoran los síntomas y retrasan el daño articular (McKown et al. (1999), Arthritis Rheum. 42:1204-1208).

Fisiológicamente, el TNF α también se asocia con la protección frente a infecciones concretas (Cerami et al. (1988), Immunol. Today 9:28). El TNF α se libera por macrófagos que se han activado con lipopolisacáridos de bacterias gramnegativas. Como tal, el TNF α parece ser un mediador endógeno con una importancia crucial implicado en el desarrollo y la patogénesis del choque endotóxico asociado con la septicemia bacteriana (Machie, et al. (1989), Br. J. Surg. 76:670-671; Debets et al. (1989), Second Vienna Shock Forum, p. 463-466; Simpson et al. (1989) Crit. Care Clin. 5: 27-47; Waage et al. (1987), Lancet 1: 355-357; Hammerle et al. (1989) Second Vienna Shock Forum p. 715-718; Debets et al. (1989), Crit. Care Med. 17:489-497; Calandra et al. (1990), J. Infect. Dis. 161:982-987; Revhaug et al. (1988), Arch. Surg. 123: 162-170).

Como con otros sistemas orgánicos, también se ha demostrado que el TNF α desempeña un papel clave en el sistema nervioso central, en particular en trastornos inflamatorios y autoinmunitarios del sistema nervioso, incluyendo esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre y miastenia grave y en trastornos degenerativos del sistema nervioso, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. El TNF α también está implicado en trastornos de sistemas relacionados de la retina y los músculos, incluyendo la neuritis óptica, la degeneración macular, la retinopatía diabética, la dermatomiositis, la esclerosis lateral amiotrófica y la distrofia muscular, así como lesiones del sistema nervioso central, incluyendo lesión cerebral traumática, lesión aguda de la médula espinal y accidente cerebrovascular.

La hepatitis es otro trastorno inflamatorio relacionado con el TNF α que, entre otros desencadenantes, puede estar causada por infecciones víricas, incluyendo Epstein-Barr, citomegalovirus y virus de la hepatitis A-E. La hepatitis provoca inflamación aguda en el hígado en la región portal y lobular, seguida de fibrosis y desarrollo de tumores. El TNF α también puede mediar la caquexia en el cáncer, que provoca la mayor parte de la morbilidad y mortalidad por

5 cáncer (Tisdale M.J. (2004), Langenbecks Arch Surg. 389:299-305).

El papel clave desempeñado por el TNF α en la inflamación, las respuestas inmunitarias celulares y la patología de muchas enfermedades ha conducido a la búsqueda de antagonistas de TNF α . Una clase de antagonistas de TNF α diseñados para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF α son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a TNF α y de este modo, bloquean su función. El uso de anticuerpo anti-TNF α ha demostrado que el bloqueo del TNF α puede revertir los efectos atribuidos al TNF α incluyendo reducciones de IL-1, GM-CSF, IL-6, IL-8, moléculas de adhesión y destrucción de tejidos (Feldmann et al. (1997), Adv. Immunol. 1997:283-350). Entre los inhibidores específicos de TNF α que se han comercializado recientemente incluyen un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano dirigido contra TNF α (infliximab, Remicade™; Centocor Corporation/Johnson & Johnson) ha demostrado eficacia clínica en el tratamiento de la RA y la enfermedad de Crohn. A pesar de estos avances, sigue habiendo necesidad de formas de anticuerpos nuevas y eficaces o de otros anticuerpos para el tratamiento de trastornos asociados con el TNF α , tales como la RA. En particular, hay una necesidad urgente de anticuerpos con propiedades funcionales óptimas para el tratamiento eficaz y continuo de la artritis y otros trastornos mediados por TNF α .

Sumario de la invención

20 La invención proporciona anticuerpos que comprenden al menos una mutación reductora de la agregación y métodos para producir dichos anticuerpos.

En un aspecto, la invención proporciona un método para reducir la propensión a la agregación de un anticuerpo, comprendiendo método introducir una o más mutaciones reductoras de la agregación en una posición de resto que participa en la interfaz entre la cadena ligera variable y la cadena pesada variable de un anticuerpo, en donde la sustitución reduce la energía libre entre la cadena ligera variable y la cadena pesada variable en al menos 0,5 kcal/mol, reduciendo de este modo la propensión a la agregación del anticuerpo modificado en comparación con el de un anticuerpo parental que carece de las modificaciones reductoras de la agregación.

En un aspecto, un método de la invención comprende introducir una o más sustituciones de aminoácidos en la interfaz de una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) del anticuerpo, en donde las una o más sustituciones están en posiciones de restos seleccionadas para reducir la energía libre entre la VL y la VH en al menos un 10%, reduciendo de este modo la propensión a la agregación del anticuerpo en comparación con un anticuerpo parental. En un aspecto particular, la secuencia de la cadena ligera variable del anticuerpo tiene al menos un 65% de identidad respecto de la secuencia de SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, la cadena pesada variable tiene por al menos un 85% de identidad respecto de la secuencia de SEQ ID NO:3 o la secuencia de SEQ ID NO: 4.

35 En determinados aspectos, un método de la invención comprende modificar el resto en la posición AHo 50 y/o el resto en la posición AHo 47 en la cadena ligera variable de un anticuerpo, reduciendo de este modo la propensión a la agregación del anticuerpo en comparación con un anticuerpo parental. En otros aspectos, el método de la invención comprende además modificar restos en la posición AHo 12, 103 y 144 de la cadena pesada variable.

La invención también proporciona anticuerpos que tienen propensión a la agregación reducida que comprenden una o más modificaciones reductoras de agregación. En determinados aspectos, un anticuerpo de la invención es un fragmento Fab, Fab', F(ab)2', un Fv monocatenario (scFv), un Fv o un anticuerpo lineal. En otros aspectos, la invención proporciona una molécula biespecífica o bivalente que comprende un anticuerpo de la invención.

En otros aspectos, la modificación reductora de la agregación se encuentra en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable. En un aspecto particular, la modificación reductora de la agregación comprende una arginina (R) en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable. En otro aspecto más, la modificación reductora de la agregación comprende una sustitución de lisina (K) por arginina (R) en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable.

En otros aspectos más, la modificación reductora de la agregación se encuentra en la posición AHo 47 de la cadena ligera variable. En un aspecto particular, la modificación reductora de la agregación comprende una arginina (R) en la posición AHo 47 de la cadena ligera variable. En otro aspecto más, la modificación reductora de la agregación comprende una sustitución de lisina (K) por arginina (R) en la posición AHo 47 de la cadena ligera variable.

La invención también proporciona anticuerpos estables y solubles específicos para TNF α , los cuales comprenden secuencias específicas de cadena ligera y cadena pesada que se optimizan para conferirles estabilidad, solubilidad, unión *in vitro* o *in vivo* de TNF α y baja inmunogenicidad. Dichos anticuerpos están diseñados para el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos mediados por TNF α . También se divulgan los ácidos nucleicos, los vectores y las células

hospedadoras para la expresión de los anticuerpos recombinantes, las cadenas ligeras variables y las cadenas pesadas variables de la invención, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

La invención también proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por TNF α , que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TNF α de la invención. En determinados aspectos, el trastorno mediado por TNF α es un trastorno ocular seleccionado entre el grupo que consiste en uveítis, enfermedad de Behçet, retinitis, ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjögren, neuropatía diabética, escleritis, degeneración macular asociada con la edad y queratitis.

Las realizaciones específicas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra curvas de titulación de posiciones de restos VL47 (líneas continuas) y VL50 (líneas discontinuas) en dos moléculas scFv diferentes, 34rFW1.4 (en negro) y 578rFW1.4 (en gris).

La figura 2A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 60 mg/ml.

- 15 La figura 2B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R_DHP en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 60 mg/ml.

La figura 3A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 40 mg/ml.

- 20 La figura 3B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R_DHP en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 40 mg/ml.

La figura 4A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 20 mg/ml.

La figura 4B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R_DHP en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 20 mg/ml.

- 25 La figura 5A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 60 mg/ml.

La figura 5B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 60 mg/ml.

- 30 La figura 6A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 40 mg/ml.

La figura 6B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 40 mg/ml.

La figura 7A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 20 mg/ml.

- 35 La figura 7B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 20 mg/ml.

La figura 8A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 60 mg/ml.

- 40 La figura 8B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_K47R en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 60 mg/ml.

La figura 9A muestra la estabilidad de 34rFW1.4 en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 20 mg/ml.

La figura 9B muestra la estabilidad de 34rFW1.4_K47R en condiciones aceleradas determinadas mediante análisis de SE-HPLC después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando una concentración de 20 mg/ml.

5 Descripción detallada de la invención

Un objetivo general de la invención es proporcionar anticuerpos estables y solubles que tienen propensión reducida a la agregación en solución. En una realización preferida, dicho anticuerpo es un anticuerpo scFv o un fragmento Fab. Los anticuerpos de la invención comprenden preferentemente una cadena ligera y pesada como se describe en el presente documento.

- 10 Los aspectos particulares mostrados en el presente documento son a modo de ejemplo y tienen la finalidad únicamente de proporcionar una descripción ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan en la causa para proporcionar lo que se considera que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y los aspectos conceptuales de diversas realizaciones de la invención. A este respecto, no se practican intentos de mostrar más detalladamente de lo necesario los detalles estructurales de la invención para la comprensión fundamental de la invención, evidenciándose para los expertos en la materia a partir de la descripción, conjuntamente con las figuras y/o los ejemplos cómo pueden realizarse en la práctica las diversas formas de la invención.

- 20 A fin de facilitar la comprensión de la presente invención, se definirán del siguiente modo ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales. Se pretende que las siguientes definiciones y explicaciones prevalezcan en cualquier construcción futura, a menos que se modifiquen clara y unívocamente en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado haga que cualquier construcción no tenga sentido o que esencialmente no tenga sentido. En los casos donde la construcción del término haga que no tenga sentido o esencialmente no tenga sentido, la definición se extraerá del diccionario Webster, 3ª edición o un diccionario conocido por los expertos en la materia, tal como el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

- El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno", "polipéptido de unión a antígeno" o "inmunoaglutinante") o una sola cadena del mismo. Un "anticuerpo" incluye una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro o una porción de unión de antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas en desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal, en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

- La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, TNF). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VH, VL, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento de un solo dominio o dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR) o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente se pueden juntar por medio de un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, se pueden juntar usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite su producción como una sola cadena de proteína en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también estarán abarcados dentro del término "porción de unión

a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se seleccionan respecto de su utilidad del mismo modo que con los anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo, por ejemplo, un anticuerpo de IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM.

La expresión “regiones marco” se refiere a las partes reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existen entre las regiones CDR, más divergentes. Dichas regiones marco se citan normalmente como regiones marco 1 a 4 (FR1, FR2, FR3 y FR4) y proporcionan un armazón para sostener, en el espacio tridimensional, las CDR encontradas en una región variable de cadena pesada o de cadena ligera de un anticuerpo, de tal forma que las CDR pueden formar una superficie de unión a antígeno. Dichas regiones marco también pueden citarse como armazones, ya que proporcionan soporte para la presentación de las CDR, más divergentes. Pueden usarse como regiones de unión a antígeno otras CDR y regiones marco de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tales como las repeticiones de anquirina y fibronectina (véanse también, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.300.064, 6.815.540 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20040132028).

El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al cual se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (por ejemplo, TNF). Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Las expresiones “unión específica”, “unión selectiva”, “se une de manera selectiva” y “se une de manera específica” se refieren a la unión de un anticuerpo a un epítipo en un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como de aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor, como se determina usando tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE.

El término “ K_D ” se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. En determinadas realizaciones, algunos anticuerpos de la invención se unen a TNF con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-7} M, tal como de menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menos, por ejemplo, como se determina usando tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE.

Tal como se usa en el presente documento, “identidad” se refiere a la comparación de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad monomérica de base o aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina o una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. El “porcentaje de identidad” entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias, dividido entre el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden, las dos secuencias tienen 60% de identidad. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten un 50% de identidad (3 de las 6 posiciones totales son coincidentes). Por lo general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para dar máxima identidad. Dicha alineación puede proporcionarse usando, por ejemplo, el método de Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453, implementado de manera conveniente por programas de computación, tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1998)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Secuencias “similares” son aquellas que, cuando se alinean, comparten restos de aminoácido idénticos y similares, en donde los restos similares son sustituciones conservadoras para restos de aminoácido correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una “sustitución conservadora” de un resto en una secuencia de referencia es una sustitución por un resto que es física o funcionalmente similar al resto de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma, carga eléctrica o propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno o similares. Por lo tanto, una secuencia “modificada con sustituciones conservadoras” es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia de tipo silvestre en que están presentes una o más sustituciones conservadoras. El “porcentaje de similitud” entre dos secuencias es una función del número de posiciones que contienen restos coincidentes o sustituciones conservadoras compartidas por las dos secuencias, dividido entre el número de posiciones comparadas x 100. Por

ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservadoras, entonces las dos secuencias tienen un 80% de similitud positiva.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “modificaciones de secuencia conservadoras” pretende hacer referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran de manera negativa las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido. Dichas modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, se pueden introducir modificaciones por técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácido conservadoras incluyen aquellas en donde el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo particular preferentemente se reemplaza con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem. 32*:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng. 12*(10):879-884 (1999); y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94*:412-417 (1997)).

“Secuencia de aminoácido consenso”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos que se puede generar usando una matriz de al menos dos y preferentemente más secuencias de aminoácido alineadas y permitiendo huecos en la alineación, de modo que es posible determinar el resto de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es aquella secuencia que comprende los aminoácidos que están representados con más frecuencia en cada posición. En el caso de que los dos o más aminoácidos estén representados de manera igual en una sola posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos de aquellos aminoácidos.

La secuencia de aminoácido de una proteína se puede analizar a varios niveles. Por ejemplo, se puede exhibir la conservación o variabilidad a nivel de un solo resto, a nivel de múltiples restos, de múltiples restos con huecos, etc. Los restos pueden exhibir conservación del resto idéntico o se pueden conservar al nivel de clase. Los ejemplos de clases de aminoácido incluyen grupos R polares, pero no cargados (serina, treonina, asparagina y glutamina); grupos R cargados positivamente (lisina, arginina e histidina); grupos R cargados negativamente (ácido glutámico y ácido aspártico); grupos R hidrófobos (alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina y tirosina); y aminoácidos especiales (cisteína, glicina y prolina). Otras clases son conocidas para un experto en la materia y se pueden definir usando determinaciones estructurales u otros datos para evaluar la capacidad de sustitución. En este sentido, un aminoácido sustituible puede referirse a cualquier aminoácido que se puede sustituir y mantener una conservación funcional en esa posición.

Sin embargo, se reconocerá que puede variar el grado de las propiedades biofísicas de los aminoácidos de la misma clase. Por ejemplo, se reconocerá que ciertos grupos R hidrófobos (por ejemplo, alanina, serina o treonina) son más hidrófilos (es decir, de mayor hidrofilia o menor hidrofobia) que otros grupos R hidrófobos (por ejemplo, valina o leucina). Se puede determinar la hidrofilia o hidrofobia relativa usando métodos reconocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Rose et al., *Science*, 229: 834-838 (1985) y Cornette et al., *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).

Tal como se usa en el presente documento, cuando una secuencia de aminoácido se alinea (por ejemplo, una primera secuencia de VH o VL) con una o más secuencias de aminoácido adicionales (por ejemplo, una o más secuencias de VH o VL en una base de datos), puede compararse una posición de aminoácido en una secuencia (por ejemplo, la primera secuencia de VH o VL) con una “posición correspondiente” en la una o más secuencias de aminoácido adicionales. Tal como se usa en el presente documento, la “posición correspondiente” representa la posición equivalente en las secuencias que se están comparando cuando las secuencias se alinean de manera óptima, es decir, cuando las secuencias se alinean para lograr el mayor grado de porcentaje de identidad o de porcentaje de similitud.

La expresión “molécula de ácido nucleico” se refiere a moléculas de ADN y a moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. Un ácido nucleico se “une operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. En determinadas realizaciones, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo de la invención, una cadena ligera variable de la invención y/o una cadena pesada variable de la invención. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica: un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 97% de identidad respecto de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 14; un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 95% de identidad respecto de SEQ ID NO: 5; o un anticuerpo que tiene al menos un 96% de identidad

respecto de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 17.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en donde se pueden unir segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en donde se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora al introducir en la célula hospedadora, y por tanto se replican junto con el genoma hospedador.

El término “célula hospedadora” se refiere a una célula en donde se ha introducido un vector de expresión. Las células hospedadoras pueden incluir células bacterianas, microbianas, vegetales o animales. Las bacterias, que son susceptibles a transformación, incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*; y *Haemophilus influenzae*. Los microbios adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las líneas celulares hospedadoras animales adecuadas incluyen CHO (líneas de ovario de hámster chino) y células NSO.

Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de “tratamiento” emplean administración a un sujeto, que necesita dicho tratamiento, un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno mediado por TNF α o un sujeto que en última instancia puede adquirir dicho trastorno, a fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente o a fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo que se espera en ausencia de dicho tratamiento.

La expresión “trastorno mediado por TNF” por lo general se refiere a estados y/o síntomas de enfermedad asociados con el TNF, incluyendo cualquier trastorno, el comienzo, progreso o la persistencia de los síntomas que requieren la participación del TNF. Los ejemplos de trastornos mediados por TNF incluyen, pero sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, carcinomas de mama, carcinomas de pulmón, carcinomas gástricos, carcinomas de esófago, carcinomas colorrectales, carcinomas de hígado, carcinomas de ovario, tecomas, arrenoblastomas, carcinomas de cuello de útero, carcinoma del endometrio, hiperplasia del endometrio, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de nasofaringe, carcinomas de laringe, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernosa, hemangioblastoma, carcinomas de páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, proliferación vascular anormal asociada con facomatosas, edema (tal como aquella asociada con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, artritis reumatoide, psoriasis y aterosclerosis. Los trastornos mediados por TNF también incluyen ojo seco y afecciones inflamatorias relacionadas con TNF α , tales como inflamación ocular, conjuntivitis alérgica, dermatitis, rinitis y asma, por ejemplo, e incluyen aquellos cambios celulares que resultan de la actividad de TNF α que conduce directa o indirectamente a la afección inflamatoria relacionada con TNF α . Además, los trastornos mediados por TNF también incluyen angiogénesis ocular, enfermedad de Behçet, retinitis, glaucoma, síndrome de Sjörgen, neuropatía diabética, escleritis, queratitis y uveítis.

La expresión “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para lograr o al menos parcialmente lograr el efecto deseado. La expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos parcialmente detener la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya sufre de la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno siendo tratado y el estado general del sistema inmunitario propio del paciente.

El término “sujeto” se refiere a cualquier humano o animal no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto con un trastorno mediado por TNF.

Los sistemas de numeración usados en el presente documento para identificar posiciones de restos de aminoácidos en regiones variables de cadena pesada y ligera corresponden al definido por A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670 (el sistema AHO). Las tablas de conversión entre el sistema AHO y el sistema más comúnmente usado definido por Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U. S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH n.º 91-3242) se proporcionan en A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

Tal como se usa en el presente documento, el término “agregación” se refiere al proceso de interacciones/asociaciones intermoleculares entre moléculas monoméricas en solución líquida que da lugar a la formación de especies oligoméricas. Se puede evaluar la agregación en condiciones de estrés usando estudios de

estabilidad acelerada en una solución concentrada. Los estudios de estabilidad acelerada están diseñados para aumentar la velocidad de degradación, agregación o de modificaciones químicas de un compuesto usando condiciones de almacenamiento extremas. Los estudios de estabilidad acelerada, también conocidos como estudios de estrés, se realizan normalmente a 40°C y a temperatura ambiente. Estos estudios de estabilidad proporcionan información valiosa con respecto al efecto de la exposición a condiciones ambientales fuera de las condiciones de almacenamiento marcadas normales, también conocidas como condiciones de estrés. En la industria farmacéutica se usan generalmente soluciones con alta concentración de proteína. El comportamiento de solución de las proteínas a altas concentraciones puede ser notablemente diferente al predicho basándose en el análisis de la solución diluida debido a la no idealidad termodinámica en estas soluciones. La no idealidad observada en estos sistemas se relaciona con las interacciones proteína-proteína (PPI). A la hora de determinar la naturaleza general y el alcance de estas PPI, diferentes tipos de fuerzas desempeñan un papel crucial y sus contribuciones relativas se ven afectadas por las propiedades del soluto y el disolvente. El papel de las PPI está dirigido por estas fuerzas intermoleculares para regir las características en solución, incluyendo la estabilidad física y la auto-asociación y la agregación de proteínas. Las soluciones concentradas son aquellas soluciones donde las PPI afectan a las proteínas en solución aumentando la tasa de oligomerización. Una solución concentrada puede tener, por ejemplo, una concentración de proteína de al menos 10 mg/ml.

Los productos solubles de este proceso pueden detectarse con métodos analíticos, tales como SE-HPLC. La expresión "modificación reductora de la agregación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una modificación, tal como una sustitución de aminoácidos, que reduce la propensión de un anticuerpo a la agregación en una solución líquida en comparación con un anticuerpo parental, tal como se describe en el presente documento. Un anticuerpo "parental" es un anticuerpo que comprende en esencia la misma secuencia que el anticuerpo correspondiente que tiene modificaciones reductoras de la agregación. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede tener las mismas CDR que el anticuerpo modificado y pueden tener exactamente la misma secuencia que el anticuerpo modificado, excepto para los restos en la posición AHo 47 y/o 50 en la secuencia de cadena ligera variable y puede diferir además en las posiciones AHo 12, 103 y 144 en la secuencia de cadena pesada variable. También pueden estar presentes otras diferencias, siempre y cuando el anticuerpo parental no contenga las modificaciones reductoras de la agregación presentes en el anticuerpo modificado de acuerdo con un método de la invención.

El término "interfaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a la interacción entre los dos dominios variables (dominios variables pesados y ligeros) de un anticuerpo. La interfaz incluye los restos de aminoácido que participan directa o indirectamente en la interacción entre los dominios variables. Dicha interacción incluye, pero sin limitación, todas las clases de interacciones sin enlace, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, unión de hidrógeno, términos electrostáticos e interacciones hidrófobas entre los dos dominios.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comúnmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o la prueba de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones. Se entiende que varias realizaciones, preferencias e intervalos pueden combinarse a voluntad. Además, dependiendo de la realización específica, pueden no ser de aplicación las definiciones, realizaciones o los intervalos.

En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TNF α y de esta manera son adecuados para bloquear la función de TNF α *in vivo*.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se optimizan con modificaciones reductoras de la agregación en relación con un anticuerpo parental, de tal forma que un anticuerpo de la invención tiene una propensión reducida a la agregación, en comparación con un anticuerpo parental/no modificado. Dichas modificaciones incluyen sustituciones de restos particulares que participan en la interfaz de la cadena ligera variable (VL) y la cadena pesada variable (VH). En algunas realizaciones, la modificación reductora de la agregación comprende al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la energía libre de la interfaz de VL-VH en comparación con la energía libre de la interfaz VL-VH del anticuerpo parental en una estrategia de modelado *in silico*, tal como se describe en el presente documento. Dichas modificaciones incluyen sustituciones de aminoácidos de restos concretos que contribuyen a la energía libre de la interfaz VL-VH.

En determinadas realizaciones, una modificación reductora de la agregación de la invención comprende una sustitución en la posición AHo 50 en la cadena VH. En una realización, la sustitución es una arginina (R) en la posición AHo 50. En otra realización, la arginina (R) en la posición AHo 50 reemplaza una lisina (K).

En otras realizaciones, una modificación reductora de la agregación de la invención comprende una sustitución en la posición AHo 47 en la cadena VL. En una realización, la sustitución es arginina (R) en la posición AHo 47. En otra realización, la arginina (R) en la posición AHo 47 reemplaza una lisina (K).

5 El sistema de numeración AHo se describe en detalle en Honegger, A. y Plückthun, A. (2001) J Mol. Biol. 309:657-670). La posición AHo 50 en la cadena ligera variable corresponde a la posición 42 de Kabat. La posición AHo 47 en la cadena ligera variable corresponde a la posición 39 de Kabat. El sistema de numeración Kabat se describe con más detalle en Kabat et al. (Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U. S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH n.º 91-3242). Las tablas de conversión entre el sistema AHo y el sistema más comúnmente usado como se define por Kabat et al. se proporcionan en A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

15 Las siguientes tablas de conversión se proporcionan para dos sistemas de numeración diferentes usados para identificar posiciones de restos de aminoácidos en regiones variables de cadena pesada y ligera. El sistema de numeración Kabat se describe con más detalle en Kabat et al. (Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U. S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH n.º 91-3242). El sistema de numeración AHo se describe con más detalle en Honegger, A y Plückthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670.

Numeración de región variable de cadena pesada

Tabla 1: Tabla de conversión para las posiciones de restos en el dominio variable de cadena pesada

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	44	51	87	101
2	2	45	52	88	102
3	3	46	53	89	103
4	4	47	54	90	104
5	5	48	55	91	105
6	6	49	56	92	106
7	7	50	57	93	107
*	8	51	58	94	108
8	9	52	59	95	109
9	10	52a	60	96	110
10	11	52b	61	97	111
11	12	52c	62	98	112
12	13	*	63	99	113
13	14	53	64	100	114
14	15	54	65	100a	115
15	16	55	66	100b	116
16	17	56	67	100c	117
17	18	57	68	100d	118
18	19	58	69	100e	119
19	20	59	70	100f	120
20	21	60	71	100g	121
21	22	61	72	100h	122
22	23	62	73	100i	123
23	24	63	74	*	124
24	25	64	75	*	125
25	26	65	76	*	126
26	27	66	77	*	127
*	28	67	78	*	128
27	29	68	79	*	129
28	30	69	80	*	130

ES 2 660 613 T3

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
29	31	70	81	*	131
30	32	71	82	*	132
31	33	72	83	*	133
32	34	73	84	*	134
33	35	74	85	*	135
34	36	75	86	*	136
35	37	76	87	101	137
35a	38	77	88	102	138
35b	39	78	89	103	139
*	40	79	90	104	140
*	41	80	91	105	141
*	42	81	92	106	142
36	43	82	93	107	143
37	44	82a	94	108	144
38	45	82b	95	109	145
39	46	82b	96	110	146
40	47	83	97	111	147
41	48	84	98	112	148
42	49	85	99	113	149
43	50	86	100		

Columna 1, posición de resto en sistema de numeración Kabat. Columna 2, número correspondiente en sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 1. Columna 3, posición de resto en sistema de numeración Kabat. Columna 4, número correspondiente en sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 3. Columna 5, posición de resto en sistema de numeración Kabat. Columna 6, número correspondiente en sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 5.

Numeración de región variable de cadena ligera

Tabla 2: Tabla de conversión para las posiciones de restos en el dominio variable de cadena ligera

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	43	51	83	101
2	2	44	52	84	102
3	3	45	53	85	103
4	4	46	54	86	104
5	5	47	55	87	105
6	6	48	56	88	106
7	7	49	57	89	107
8	8	50	58	90	108
9	9	*	59	91	109
10	10	*	60	92	110
11	11	*	61	93	111
12	12	*	62	94	112
13	13	*	63	95	113
14	14	*	64	95a	114
15	15	*	65	95b	115
16	16	*	66	95c	116
17	17	51	67	95d	117
18	18	52	68	95e	118

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
19	19	53	69	95f	119
20	20	54	70	*	120
21	21	55	71	*	121
22	22	56	72	*	122
23	23	57	73	*	123
24	24	58	74	*	124
25	25	59	75	*	125
26	26	60	76	*	126
27	27	61	77	*	127
*	28	62	78	*	128
27a	29	63	79	*	129
27b	30	64	80	*	130
27c	31	65	81	*	131
27d	32	66	82	*	132
27e	33	67	83	*	133
27f	34	68	84	*	134
*	35	*	85	*	135
28	36	*	86	*	136
29	37	69	87	96	137
30	38	70	88	97	138
31	39	71	89	98	139
32	40	72	90	99	140
33	41	73	91	100	141
34	42	74	92	101	142
35	43	75	93	102	143
36	44	76	94	103	144
37	45	77	95	104	145
38	46	78	96	105	146
39	47	79	97	106	147
40	48	80	98	107	148
41	49	81	99	108	149
42	50	82	100		

Columna 1, posición de resto en sistema de numeración Kabat. Columna 2, número correspondiente en sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 1. Columna 3, posición de resto en sistema de numeración Kabat. Columna 4, número correspondiente en sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 3. Columna 5, posición de resto en sistema de numeración Kabat. Columna 6, número correspondiente en sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 5.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender modificaciones adicionales según se desee. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender sustituciones de aminoácidos para reducir su inmunogenicidad *in vivo* de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 12/973.968 y/o sustituciones para potenciar la solubilidad del anticuerpo, como se describe en el documento WO 09/155725. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo); serina (S) o treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y/o serina (S) o treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo). Adicionalmente, el anticuerpo puede comprender serina (S) o treonina (T) en las posiciones 97, 98 y/o 99 de cadena pesada (numeración AHo). Preferentemente, el anticuerpo comprende serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo).

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable:

SEQ ID NO: 1:

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGRAPKLLIY(X)_{n=1-50}
GVPSRFGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable (las CDR están subrayadas):

SEQ ID NO: 2:

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLG

En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende la cadena pesada variable:

SEQ ID NO: 3: armazón de cadena pesada variable

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

En otra realización más, un anticuerpo de la invención comprende el armazón de cadena pesada variable

SEQ ID NO: 4:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención comprende la cadena pesada variable (las CDR están subrayadas):

SEQ ID NO: 5:

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRYSYICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDND
ITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARLGADYAYDLWGQG
TTVTVSS

Tal como se usa en el presente documento, los restos X son sitios de inserción de CDR. X puede ser cualquier aminoácido de origen natural; pueden estar presentes al menos tres y hasta 50 aminoácidos.

En una realización, el armazón de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende la SEQ ID NO: 1 y el armazón de cadena pesada variable comprende la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el armazón de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% identidad respecto de la SEQ ID NO: 1. Lo más preferentemente, dicha secuencia tiene una arginina (R) en la posición AHo 50. En otra realización, dicha secuencia tiene una arginina (R) en la posición AHo 47.

En otra realización, el armazón de cadena pesada variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 3. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo).

En otra realización, el armazón de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 97%, 98%, más preferentemente un 99% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el armazón de cadena pesada variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 5.

- 5 En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 17.

En otra realización, el armazón de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 14 y el armazón de cadena pesada variable comprende la SEQ ID NO: 5.

- 10 En una realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención son anticuerpos monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab. En el caso de anticuerpos scFv, puede unirse un dominio VL a un dominio VH en cualquier orientación mediante un enlazador flexible. Un enlazador adecuado del estado de la técnica consiste en las secuencias de aminoácido GGGGS repetidas (SEQ ID NO: 6) o variantes de las mismas. En una realización preferida de la presente invención, se usa un enlazador (GGGGS)₄ (SEQ ID NO:7) o su derivado, pero también son posibles variantes de 1-3 repeticiones (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448).
 15 Otros enlazadores que se pueden usar para la presente invención se describen por Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 y Roovers et al. (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59. La distribución puede ser VL-enlazador-VH o VH-enlazador-VL, prefiriéndose la primera orientación. En el caso de fragmentos Fab, los dominios variables de cadena ligera seleccionados VL se fusionan a la región constante de una cadena de Ig kappa humana, mientras que los dominios variables de cadena pesada VH adecuados se fusionan al
 20 primer dominio constante (N-terminal) CH1 de una IgG humano. En el extremo C-terminal, se forma un puente disulfuro inter-cadena entre los dos dominios constantes.

Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 8:

```
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X)n=1-50WYQQKPGRAPKLLIY (X)n=1-50
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYC (X)n=1-50FGQGTKLTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS (X)n=1-50
WVRQAPGKGLEWVG (X)n=1-50RFTISRDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCAR (X)n=1-50WGQGTLVTVSS
```

- 25 En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 9:

```
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X)n=1-50WYQQRPKGKAPKLLIY (X)n=1-50
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYC (X)n=1-50FGQGTKLTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS (X)n=1-50
WVRQAPGKGLEWVG (X)n=1-50RFTISKDTSKNTVYLQMNSLR
AEDTAVYYCAR (X)n=1-50WGQGTLVTVSS
```

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 10:

- 30 (34rFW1.4_VL_K50R_DHP):

```
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRYSWICWVR
QAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATY
YCARLGYADYAYDLWGQGTITVTVSS
```

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable:

SEQ ID NO: 11: almacén de cadena ligera variable de FW1.4 (K127)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X) _{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY (X) _{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC (X) _{n=1-50} FGQGTKLTVLG

En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable:

5 SEQ ID NO: 12: almacén de cadena ligera variable sustituida de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X) _{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY (X) _{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC (X) _{n=1-50} FGQGTKLTVLG

En otra realización más preferida, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 13:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X) _{n=1-50} WYQQRPGKAPKLLIY (X) _{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC (X) _{n=1-50} FGQGTKLTVLG

10 En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable (las CDR están subrayadas):

SEQ ID NO: 14:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC QSSQSVYGNIWMA WYQQRPGKAPKLLIY QASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC QGNFNTGDRYA FGQGTKLTVL

Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 15:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X) _{n=1-50} WYQQRPGKAPKLLIY (X) _{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC (X) _{n=1-50} FGQGTKLTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS (X) _{n=1-50}
WVRQAPGKGLEWVG (X) _{n=1-50} RFTISRDTSKNTVYLMNS
15 LRAEDTAVYYCAR (X) _{n=1-50} WGQGTLLTVSS

En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 16:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC (X) _{n=1-50} WYQQRPGKAPKLLIY (X) _{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC (X) _{n=1-50} FGQGTKLTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS (X) _{n=1-50}
WVRQAPGKGLEWVG (X) _{n=1-50} RFTISKDTSKNTVYLMNSLR
AEDTAVYYCAR (X) _{n=1-50} WGQGTLLTVSS

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

20 SEQ ID NO: 17:
(34rFW1.4_VL_K47R_DHP):

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQRPGKAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSGVQPGGSLRLSCTASGFTISRYSWICWVR
QAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLYQMNSLRAEDTATY
YCARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

En otra realización más, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 18:

(34rFW1.4)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQRPGKAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSGVQPGGSLRLSCTASGFTISRYSWICWVR
QAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLYQMNSLRAEDTATY
YCARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

5

En una realización, la VL de un anticuerpo parental es o comprende la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad, más preferentemente un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% respecto de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12. En otra realización preferida, la VH del anticuerpo parental es o comprende la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad, más preferentemente un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% respecto de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

10

Un anticuerpo de la invención que comprende una modificación reductora de la agregación comprende preferentemente una o más CDR de un anticuerpo de conejo. Como es sabido en la técnica, las CDR de conejo son diferentes de las CDR de humano o roedor; pueden contener restos de cisteína que se ligan con disulfuro al armazón o forman puentes S-S entre las CDR. Además, las CDR de conejo a menudo no pertenecen a cualquier estructura canónica previamente conocida.

15

La presente invención también presenta moléculas bivalentes y biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-TNF α , o un fragmento del mismo de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, se pueden derivatizar o enlazar a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de la invención se puede derivatizar o enlazar a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; se pretende que dichas moléculas multiespecíficas también estén abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de moléculas biespecíficas incluyen un diacuerpo, un diacuerpo monocatenario y un anticuerpo en tándem, como es sabido por los expertos en la materia.

20

25

Para crear una molécula biespecífica de la invención, puede unirse funcionalmente un anticuerpo de la invención (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otros) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, antígenos específicos tumorales o específicos de patógenos, péptido o mimético de unión, de modo que se obtiene como resultado una molécula biespecífica. Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera molécula de unión que tiene especificidad por TNF α y una segunda molécula de unión que tiene especificidad por uno o más epítopos diana adicionales.

30

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden una especificidad de unión de al menos un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción monocatenaria como se describe en Ladner et al., Patente de los Estados Unidos n.º 4.946.778, cuyo contenido se incorpora expresamente por referencia.

35

Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

40

Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constitutivas usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de acoplamiento o agentes entrelazadores para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrelazamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenileno-dimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfo-succinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, y Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139:2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante unión de sulfhidrilo, por ejemplo, a través de las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas u otros sitios, ya sean de origen natural o introducidos artificialmente. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de restos de sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, pueden codificarse ambas especificidades de unión pueden codificar en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil en los casos donde la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Además, una molécula biespecífica puede ser un scFv que se une específicamente a una primera diana, en donde la VH y VL de dicho scFv están unidas con un enlazador flexible que comprende un dominio que proporciona unión específica a una segunda diana. Se describen enlazadores adecuados, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 2010/006454. Se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.260.203; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.455.030; la Patente de los Estados Unidos n.º 4.881.175; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.132.405; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.091.513; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.476.786; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.013.653; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.258.498; y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar, por ejemplo, por ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento) o por ensayo inmunotransferencia. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, se pueden detectar los complejos de TNF-anticuerpo usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ligado a enzimas que reconoce y se une de manera específica a los complejos de anticuerpo-TNF. Como alternativa, se pueden detectar los complejos usando cualquiera de una variedad de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar radiactivamente y se usa en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Séptimo Curso de Entrenamiento en Técnicas de Ensayo de Radioligando, The Endocrine Society, marzo de 1986, que se incorpora al presente documento por referencia). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autoradiografía.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir los anticuerpos descritos en el presente documento. Los métodos para producir anticuerpos que tienen propensión reducida a la agregación en solución proporcionados en el presente documento se basan en la sorprendente observación de que mediante la modulación de la interacción del dominio de anticuerpo entre la cadena ligera y la cadena pesada, puede reducirse la propensión a la agregación de los anticuerpos y que pueden predecirse de manera fiable mutaciones reductoras de la agregación determinando la energía libre de la interfaz VL/VH, definida como la diferencia entre la energía libre del anticuerpo (tal como un scFv) y los dominios variables individuales. Tal como se muestra en el presente documento, pueden efectuarse sustituciones reductoras de la agregación que modulan la interacción del dominio de anticuerpo reduciendo la energía libre entre los dominios variables sin afectar a la estabilidad o a la actividad de unión del anticuerpo.

En una realización, un método de la invención comprende las etapas de:

- (i) proporcionar un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH);
- (ii) identificar una o más posiciones de restos que participan en la interfaz entre la cadena ligera variable (VL) y la cadena pesada variable (VH) del anticuerpo; y
- (iii) modificar el anticuerpo introduciendo una sustitución en las posiciones de restos identificadas, de modo que las sustituciones reducen la energía libre entre los dominios VL y VH en al menos 0,5 kcal/mol, preferentemente al menos 1,0 kcal/mol y lo más preferentemente en al menos 2,0 kcal/mol (es decir, la energía libre entre los

dominios de VL y VH con la sustitución es al menos 0,5 kcal/mol menor que la energía libre entre los dominios VL y VH correspondientes que no comprenden la sustitución de aminoácidos), reduciendo de este modo la propensión a la agregación del anticuerpo modificado en comparación con la de un anticuerpo parental.

Como se indicó anteriormente, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un Fab, un $F(ab')_2$, un Fv monocatenario (scFv), un fragmento Fv, un diacuerpo, un diacuerpo monocatenario, un anticuerpo en tándem o un anticuerpo lineal; En una realización preferida, el anticuerpo es un Fv monocatenario (scFv).

En una realización preferida, la identificación de la una o más posiciones de restos que participan en la interfaz entre la cadena ligera variable y la cadena pesada variable del anticuerpo (es decir, la etapa (ii)) implica la determinación de la energía libre entre la interfaz VL – VH. Esto se puede realizar usando programas bioinformáticos comúnmente conocidos. Un ejemplo de un programa bioinformático adecuado es CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics).

A fin de determinar la energía libre entre la interfaz VL – VH, típicamente, se proporciona una presentación molecular atómica completa de la proteína. La energía libre de la interfaz es la diferencia de energía entre el anticuerpo entero que comprende ambos dominios variables VL y VH y la suma de las energías de los dominios individuales en el contexto de un método de solvente implícito. Esto implica tres cálculos de energía únicos, (1) en la G(a) del anticuerpo; (2) en la G(b) de la VL; y (3) en la G(c) de la VH. Por consiguiente, la energía libre de la interfaz es

$$G \text{ interfaz} = G(a) - G(b) - G(c)$$

En una realización, el método de solvente implícito es GBMV o PBSA como es sabido en la técnica.

La determinación de energía libre puede comprender además la etapa de simular la distribución de carga de la proteína. Dicha distribución de carga se puede simular basándose en las fuerzas electroestáticas o de van der Waals.

Para determinar una modificación adecuada, pueden elegirse para su sustitución uno o más restos de aminoácido que participan en la interfaz. Por ejemplo, se genera un modelo molecular de la proteína que comprende las una o más sustituciones (por ejemplo, cambiando uno o más restos por alanina) en las posiciones seleccionadas y se determina la energía libre de la interfaz de la presentación molecular sustituida. Si la energía libre de la interfaz del modelo molecular sustituido es menor que la energía libre de la interfaz del modelo molecular inicial, se selecciona el resto de aminoácido para su sustitución. Dentro del contexto de CHARMM, se pueden construir mutaciones, por ejemplo, con el protocolo Build Mutants. Las una o más sustituciones en el modelo molecular pueden estar en las posiciones que son conocidas o se sospecha están implicadas en la interfaz VL/VH.

En una realización, se realiza una etapa adicional de minimización de energía del modelo molecular que comprende las una o más sustituciones en las posiciones seleccionadas en el área aproximadamente las mutaciones. Dicha área se puede ajustar a 10 Angstrom.

En una realización, una posición de resto identificada para su sustitución está ocupada por un aminoácido cargado.

Un anticuerpo producido por un método de la invención puede comprender cualquier cadena ligera o cadena pesada variable adecuada como es sabido en la técnica y comprende preferentemente al menos una CDR de un anticuerpo de conejo. En el presente documento se describen determinadas cadenas ligeras y pesadas variables preferidas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender: un armazón de VL de anticuerpo que tiene al menos un 65% de identidad, más preferentemente un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% respecto de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, que comprende además arginina (R) en la posición AHo 47 y/o en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable; y un armazón de VH de anticuerpo que tiene al menos un 80% de identidad, más preferentemente un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% respecto de la SEQ ID NO: 3.

La modificación de la una o más posiciones de restos se hace preferentemente de acuerdo con las enseñanzas del documento PCT/CH2008/000285, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Brevemente, para un subtipo de anticuerpo dado, ciertos aminoácidos están presentes en posiciones de restos específicas del armazón del anticuerpo. Por ejemplo,

a) para una región variable de cadena pesada VH3 humana, los aminoácidos preferidos son:

(i) glutamina (Q) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;

(ii) glutamina (Q) en la posición 6 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;

- (iii) treonina (T) o alanina (A) en la posición 7 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
- (iv) alanina (A), valina (V) o fenilalanina (F) en la posición 89 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 78 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat); y/o
- 5 (v) arginina (R), glutamina (Q), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M) o fenilalanina (F) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 89 de aminoácido usando numeración Kabat);
- b) para una región variable de cadena pesada de la familia de VH1a humano, los aminoácidos preferidos son:
- (i) ácido glutámico (E) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
- (ii) ácido glutámico (E) en la posición 6 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
- 10 (iii) leucina (L) en la posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 11 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (iv) metionina (M) en la posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (v) ácido glutámico (E) o glutamina (Q) en la posición 14 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- 15 (vi) leucina (L) en la posición 19 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 18 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (vii) isoleucina (I) en la posición 21 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- 20 (viii) fenilalanina (F), serina (S), histidina (H) o ácido aspártico (D) en la posición 90 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 79 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (ix) ácido aspártico (D) o glutamina (Q) en la posición 92 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 81 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (x) glicina (G), asparagina (N) o treonina (T) en la posición 95 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 82b de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- 25 (xi) treonina (T), alanina (A), prolina (P) o fenilalanina (F) en la posición 98 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 84 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- c) para una región variable de cadena pesada de la familia de VH1b humano, los aminoácidos preferidos son:
- (i) ácido glutámico (E) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
- 30 (ii) treonina (T), prolina (P), valina (V) o ácido aspártico (D) en la posición 10 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 9 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (iii) leucina (L) en la posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 11 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (iv) valina (V), arginina (R), glutamina (Q) o metionina (M) en la posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- 35 (v) ácido glutámico (E), arginina (R) o metionina (M) en la posición 14 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- (vi) arginina (R), treonina (T) o asparagina (N) en la posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 19 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- 40 (vii) isoleucina (I), fenilalanina (F) o leucina (L) en la posición 21 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(viii) lisina (K) en la posición 45 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 38 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(ix) treonina (T), prolina (P), valina (V) o arginina (R) en la posición 47 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 40 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

5 (x) lisina (K), histidina (H) o ácido glutámico (E) en la posición 50 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 43 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(xi) isoleucina (I) en la posición 55 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 48 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

10 (xii) lisina (K) en la posición 77 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 66 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(xiii) alanina (A), leucina (L) o isoleucina (I) en la posición 78 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 67 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(xiv) ácido glutámico (E), treonina (T) o alanina (A) en la posición 82 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 71 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

15 (xv) treonina (T), serina (S) o leucina (L) en la posición 86 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 75 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(xvi) ácido aspártico (D), asparagina (N) o glicina (G) en la posición 87 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 76 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

20 (xvii) asparagina (N) o serina (S) en la posición 107 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 93 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

d) para una región variable de cadena ligera de la familia de Vkappa1 humano, los aminoácidos preferidos son:

(i) ácido glutámico (E) o isoleucina (I) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHO o de Kabat;

(ii) valina (V) o isoleucina (I) en la posición 3 de aminoácido usando sistema de numeración AHO o de Kabat;

25 (iii) valina (V), leucina (L) o isoleucina (I) en la posición 4 de aminoácido usando sistema de numeración AHO o de Kabat;

(iv) glutamina (Q) en la posición 24 de aminoácido usando sistema de numeración AHO o de Kabat;

(v) arginina (R) o isoleucina (I) en la posición 47 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 39 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

30 (vi) arginina (R), ácido glutámico (E), treonina (T), metionina (M) o glutamina (Q) en la posición 50 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 42 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(vii) histidina (H), serina (S) o fenilalanina (F) en la posición 57 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 49 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

35 (viii) fenilalanina (F) en la posición 91 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 73 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

(ix) valina (V), serina (S), glicina (G) o isoleucina (I) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHO (posición 85 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);

e) para una región variable de cadena ligera de la familia de Vkappa3 humano, los aminoácidos preferidos son:

40 (i) treonina (T) en la posición 2 de aminoácido usando sistema de numeración AHO o de Kabat;

- (ii) treonina (T) en la posición 3 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (iii) isoleucina (I) en la posición 10 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (iv) tirosina (Y) en la posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (v) serina (S) en la posición 18 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - 5 (vi) alanina (A) en la posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (vii) metionina (M) en la posición 56 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 48 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - (viii) valina (V) o treonina (T) en la posición 74 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 58 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - 10 (ix) asparagina (N) en la posición 94 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 76 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - (x) tirosina (Y) o serina (S) en la posición 101 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 83 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - 15 (xi) leucina (L) o alanina (A) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 85 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
- f) para una región variable de cadena ligera de la familia de V λ 1 humano, los aminoácidos preferidos son:
- (i) leucina (L), serina (S) o ácido glutámico (E) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - 20 (ii) alanina (A), prolina (P), isoleucina (I) o tirosina (Y) en la posición 2 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (iii) valina (V) o metionina (M) en la posición 4 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (iv) ácido glutámico (E) en la posición 7 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (v) alanina (A) en la posición 11 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - 25 (vi) treonina (T) o serina (S) en la posición 14 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o de Kabat;
 - (vii) histidina (H) en la posición 46 de aminoácido usando sistema de numeración AHo 46 (posición 38 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - (viii) treonina (T), serina (S), asparagina (N), glutamina (Q) o prolina (P) en la posición 53 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 45 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - 30 (ix) arginina (R) o glutamina (Q) en la posición 82 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 66 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - (x) glicina (G), treonina (T) o ácido aspártico (D) en la posición 92 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 74 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat);
 - 35 (xi) valina (V), treonina (T), histidina (H) o ácido glutámico (E) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 85 de aminoácido usando sistema de numeración de Kabat).

Por consiguiente, las sustituciones hechas en el presente método siguen preferentemente las enseñanzas del documento PCT/CH2008/000285. La determinación de subtipo es conocida por el experto en la materia.

En una realización, un método de la invención comprende la modificación de un anticuerpo en la posición AHo 47 y/o 50 de la cadena ligera variable, en particular de una cadena ligera variable de V κ 1. Preferentemente, el

anticuerpo se modifica para que comprenda arginina (R) en la posición AHo 47 y/o posición AHo 50 de la cadena ligera variable. En algunas realizaciones, se sustituye lisina (K) por arginina (R) en la posición AHo 47 y/o la posición AHo 50 de la cadena ligera variable. Ya que los anticuerpos de la invención pueden comprender modificaciones adicionales según se desee, los métodos de la invención pueden comprender la etapa adicional de modificar el anticuerpo, tal como para que comprenda serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo); serina (S) o treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo). Adicionalmente, el anticuerpo se puede modificar para que comprenda serina (S) o treonina (T) en las posiciones 97, 98 y/o 99 de cadena pesada (numeración AHo). Preferentemente, el método comprende la etapa de modificar el anticuerpo para que comprenda serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo).

La invención proporciona además un método de generar un anticuerpo humanizado con una propensión baja a la agregación en solución, comprendiendo el método seleccionar un armazón de cadena ligera variable que comprende arginina (R) en la posición AHo 47 y/o en la posición AHo 50. El método puede comprender además seleccionar un armazón de cadena pesada variable que comprende una serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo); serina (S) o treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y/o serina (S) o treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo). En una realización, un armazón identificado basándose en un criterio de selección seleccionado se puede modificar adicionalmente con una modificación reductora de la agregación de la invención. Por ejemplo, si se identifica un armazón de cadena ligera variable que tiene una arginina (R) en la posición 50, el resto en la posición AHo se puede sustituir con un aminoácido diferente, tal como arginina (R) o si se identifica una cadena pesada variable que tiene una serina (S) en la posición 12 AHo, los restos en las posiciones 103 y 144 AHo se pueden sustituir con treonina.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que comprende CDR no humanas y secuencias de armazón de cadena variable pesada humanas o derivadas de humano y/o de cadena ligera variable humanas o derivadas de humano. La humanización de los anticuerpos es de sobra conocida en la técnica. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende al menos una y preferentemente las seis CDR de un anticuerpo producido en un conejo o seleccionada de una biblioteca de CDR.

Los armazones de anticuerpo variables pueden seleccionarse, por ejemplo, de una base de datos (tal como la base de datos de Kabat, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), VBASE2 (<http://vbase2.org/>), la base de datos de Kabat de Sequences of Proteins of Immunological interest (<http://www.kabatdatabase.com/index.html>), la Universal Protein Resource (UniProt; <http://pir.georgetown.edu/>), y base de datos Abysis (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>), basándose en la identidad y/o la similitud con las secuencias de armazón variable del anticuerpo en el que se originaron las CDR o basándose en secuencias de armazón por lo demás preferidas.

Se encuentran disponibles diversos programas informáticos para buscar secuencias de armazón humanas adecuadas que cumplen los requisitos seleccionados. Por ejemplo, "KabatMan" es una versión habilitada para búsquedas por ordenador de los datos de la secuencia de anticuerpo de Kabat del libro Sequences of immunological interest. El programa KabatMan se describe en el artículo: Martin (1996) "Accessing the Kabat Antibody Sequence Database" de Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25, 130-133, y está disponible en <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>, y <http://www.bioinf.org.uk/abs/kabatman.html>. La base de datos Abysis, en <http://www.bioinf.org.uk/abysis/>, integra datos de secuencia de Kabat, IMGT y PDB con datos estructurales de la PDB. Proporciona una interfaz comprensiva de apuntar y hacer clic que permite a una persona buscar los datos de secuencia en varios criterios y mostrar resultados en formatos diferentes. Para datos de la PDB, se pueden combinar búsquedas de secuencia con restricciones estructurales.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo generado por el método descrito en el presente documento. En una realización preferida, dicho anticuerpo comprende una estructura de anticuerpo VL que tiene al menos un 80% de identidad, más preferentemente un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% respecto de la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 13; preferentemente, el anticuerpo comprende arginina (R) en la posición AHo 47 y/o en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable.

Además o como alternativa, la estructura de anticuerpo VH es o comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad, más preferentemente un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente un 99% respecto de la SEQ ID NO: 3.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona además

(1) Un método para reducir la propensión a la agregación de un anticuerpo que sea un complejo heterodimérico que comprende dominios variables pesados y ligeros, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar una presentación molecular atómica completa del anticuerpo;

- (b) determinar la energía libre de la interfaz entre ambos dominios;
 (c) elegir uno o más restos de aminoácido que participan en la interfaz para su sustitución proporcionando un modelo molecular del anticuerpo que comprende las una o más sustituciones en las posiciones seleccionadas y determinando la energía libre de la interfaz de la presentación molecular sustituida;
 5 (d) seleccionar un resto de aminoácido para su sustitución si la energía libre de la interfaz del modelo molecular sustituido es menor que la energía libre de la interfaz del modelo molecular inicial;
- (2) Un método de (1), en donde la energía libre de la interfaz se determina al calcular la diferencia de energía entre el complejo y la suma de las energías de los dominios individuales en el contexto de un método de solvente implícito;
 10 (3) El método de (2), en donde el solvente es GBMV o PBSA;
 (4) El método de uno cualquiera de (1)-(3) anteriores, que comprende además la etapa de
- (i) simular la distribución de carga de la proteína, en donde dicha etapa se realiza entre la etapa a y b;
- (5) El método de (4), en donde la distribución de carga se simula basándose en fuerzas electrostáticas o de van der Waals;
 15 (6) El método de una cualquiera de (1)-(5) anteriores, en donde la etapa (c) comprende la etapa adicional de minimización de la energía en el área aproximadamente la mutación;
 (7) El método de una cualquiera de (1)-(7) anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento variable monocatenario (scFv).
- Los anticuerpos de la invención pueden generarse usando técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Conociendo las secuencias de los polipéptidos, pueden generarse los ADNc que las codifican mediante síntesis génica por métodos bien conocidos en la técnica. Estos ADNc pueden clonarse en vectores plasmídicos adecuados.
- Pueden usarse técnicas de clonación y mutagénesis convencionales bien conocidas por los expertos en la materia para acoplar enlazadores, dominios reorganizados o construcciones de fusión para la producción de fragmentos Fab. Los protocolos básicos que divulgan los métodos de la presente invención se describen en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook y Russell, 3ª ed. 2001) y en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1999).
- La secuencia de ADN que porta un gen que codifica un polipéptido de scFv o en el caso de fragmentos Fab, que codifica o dos genes separados o un operón bicistrónico que comprende los dos genes para la VL-Ck y se clonan las fusiones VH-CH1 en un vector de expresión adecuado, preferentemente uno con un promotor inducible. Debe tomarse la precaución de que esté presente delante de cada gen un sitio de unión a ribosomas que asegure la traducción. Ha de entenderse que los anticuerpos de la presente invención comprenden las secuencias divulgadas más que consistir en estas. Por ejemplo, las estrategias de clonación pueden requerir que se prepare una construcción a partir de la cual se produzca un anticuerpo que tenga presentes uno o unos pocos restos adicionales en el extremo N-terminal. Específicamente, la metionina procedente del codón de inicio puede estar presente en la proteína final en los casos donde no se haya escindido postraduccionalmente. La mayoría de las construcciones para los anticuerpos scFv dan lugar a una alanina adicional en el extremo N-terminal. En una realización preferida de la presente invención, se selecciona un vector de expresión para expresión periplásmica en *E. coli* (Krebber, 1997). Dicho vector comprende un promotor delante de una secuencia de señal escindible. La secuencia codificante para el péptido del anticuerpo se fusiona a continuación en fase con la secuencia de señal escindible. Esto permite dirigir el polipéptido expresado al periplasma bacteriano, donde se escinde la secuencia de señal. Después, se pliega el anticuerpo. En el caso de fragmentos Fab, tanto el VL-Ck como los péptidos de fusión de VH-CH1 deben unirse a una señal de exportación. El enlace S-S covalente se forma en las cisteínas C-terminales después de que los péptidos hayan alcanzado el periplasma. Si se prefiere la expresión citoplasmática de los anticuerpos, dichos anticuerpos pueden obtenerse normalmente con altos rendimientos en cuerpos de inclusión, que pueden separarse fácilmente de otros fragmentos y proteínas celulares. En este caso, los cuerpos de inclusión se solubilizan en un agente desnaturante, tal como, por ejemplo, clorhidrato de guanidina (GndHCl) y después vuelven a plegarse mediante procedimientos de renaturalización de sobra conocidos por los expertos en la materia.
- Los plásmidos que expresan los polipéptidos de scFv o Fab se introducen en un hospedador adecuado, preferentemente una célula bacteriana, de levadura o de mamífero, lo más preferentemente una cepa de *E. coli* adecuada como, por ejemplo, JM83 para expresión periplásmica o BL21 para expresión en cuerpos de inclusión. El polipéptido se puede recoger del periplasma o de cuerpos de inclusión y se purifica usando técnicas convencionales, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, cromatografía de afinidad y/o filtración en gel conocidas por los expertos en la materia.
- Los anticuerpos de la invención se pueden caracterizar con respecto a su rendimiento, solubilidad y estabilidad *in vitro*. Por ejemplo, pueden evaluarse las capacidades de unión a TNF, preferentemente a TNFα humano, *in vitro*

mediante ELISA o resonancia de plasmón superficial (BIACore), usando TNF humano recombinante, como se describe en el documento WO9729131, también permitiendo este último método permitiendo determinar la constante de velocidad koff, que debería ser preferentemente de menos de 10^{-3}s^{-1} . Se prefieren valores de $K_d \leq 10\text{ nM}$.

- 5 En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TNF α y de esta manera son adecuados para bloquear la función de TNF α *in vivo*. En una realización particular, el anticuerpo anti-TNF α comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 17.

- 10 Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos anti-TNF de la invención se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable, tal como aquellas discutidas anteriormente, incluyendo aquellas que pueden administrarse a un ser humano por vía intravenosa embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por ejemplo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intra-cerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, intraocular, intranasal, ótica, sublingual, transdérmica o por inhalación. Los anticuerpos también se administran de manera adecuada por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos.

- 15 Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis adecuada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y el transcurso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra al paciente de manera adecuada de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

- 20 Los anticuerpos anti-TNF de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial es de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, $0,1\text{--}20\text{ mg/kg}$) de anticuerpo para su administración al paciente ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria o semanal típica se encontrará en el intervalo de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, se repite el tratamiento hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos adecuados, incluyendo, por ejemplo, obtención de imágenes radiográficas del tumor.

- 30 De acuerdo con otra realización de la invención, puede mejorarse la eficacia del anticuerpo para prevenir o tratar la enfermedad mediante la administración del anticuerpo en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para estos fines, tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento de fibroblastos ácido o básico (FGF) o del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad coagulante del factor tisular, la proteína C o la proteína S (véase Esmon et al., Publicación de patente PCT n.º WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), un anticuerpo capaz de unirse al receptor HER2 (véase Hudziak et al., Publicación de Patente PCT n.º WO 89/06692, publicada el 27 de julio de 1989) o uno o más agentes terapéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antagonistas del ácido fólico, antimetabolitos del metabolismo de los ácidos nucleicos, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol o corticosteroides. Dichos otros agentes pueden estar presentes en la composición que se está administrando o pueden administrarse por separado. Asimismo, el anticuerpo se administra de manera adecuada en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, ya implique irradiación o administración de sustancias radiactivas.

- 45 Los anticuerpos de la invención pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan sobre una fase sólida, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene una proteína diana (o un fragmento de la misma) a la que se une el anticuerpo, tal como TNF en el caso de anticuerpos anti-TNF α que se van a purificar y posteriormente, se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra, salvo por la proteína diana, que se une al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, se lava el soporte con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina a pH 5,0, que liberará la proteína diana del anticuerpo.

Los anticuerpos también pueden ser útiles en ensayos diagnósticos para una proteína diana, por ejemplo, detectar su expresión en células específicas, tejidos o suero. Dichos métodos diagnósticos pueden usarse en el diagnóstico del cáncer.

- 55 Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará normalmente con un resto detectable. Se encuentran disponibles múltiples marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S . El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991), por ejemplo y se puede medir la radioactividad usando conteo de centelleo.

5 (b) Marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína o sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y Texas Red que están disponibles. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo usando, por ejemplo, las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente citado. Se puede cuantificar la fluorescencia usando un fluorímetro.

10 (c) Están disponibles diversos marcadores de sustrato enzimático y la Patente de los Estados Unidos n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima por lo general cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir usando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se describieron antes técnicas para
15 cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y entonces puede emitir luz que se puede medir (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de los Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa malato, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por
20 ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981). Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenileno diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

30 (ii) Fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, P-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Se encuentran disponibles para los expertos en la materia numerosas combinaciones de enzima-sustrato diferentes. Para una revisión general de estos, véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.275.149 y 4.318.980. En
35 ocasiones, el marcador se conjuga indirectamente al anticuerpo. Los expertos en la materia serán conscientes de las diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, puede conjugarse el anticuerpo con biotina y cualquiera de las amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente puede conjugarse a avidina o viceversa. La biotina se une de manera selectiva a avidina y, por lo tanto, puede conjugarse el marcador al anticuerpo de este modo indirecto. Como alternativa, para lograr una conjugación indirecta del marcador al anticuerpo, se conjuga el
40 anticuerpo con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y se conjuga uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, puede lograrse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En determinadas realizaciones, no se necesita etiquetar un anticuerpo, y la presencia del mismo se puede detectar usando un anticuerpo marcado que se une a un anticuerpo diana.

45 Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitivos, ensayos directos e indirectos en sándwich y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los ensayos de unión competitivos dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión a una cantidad limitada de anticuerpos. Por ejemplo, la cantidad de proteína de
50 TNF en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos por lo general se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar de manera conveniente del patrón y el analito que permanecen no unidos.

Los ensayos en sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica o epítipo diferente de la proteína que se va a detectar. En un ensayo en sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une por un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido y después un segundo anticuerpo se une al analito, de esta manera formando un complejo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.376.110. El segundo anticuerpo se puede marcar por sí mismo usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con una porción detectable (ensayo en sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo en sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso la porción detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido, tal como una muestra de tumor, puede ser fresca o congelada o se puede incluir en parafina y se fija con un conservador tal como, por ejemplo, formalina.

- 10 Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos diagnósticos de tumor *in vivo*. Por lo general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (tal como, ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que se puede localizar el tumor usando inmunoescintigrafía.

- 15 Un anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit, una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo diagnóstico. En los casos donde el anticuerpo se marca con una enzima, el equipo incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos, tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución, proporcionarán una solución de reactivo que tenga la concentración adecuada.

La invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención con fines terapéuticos. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-TNF para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF.

- 25 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en una forma tal que permite que la actividad biológica del anticuerpo sea inequívocamente efectiva y que no contienen componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los cuales se administrará la formulación. Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado.

- 30 Una formulación "estable" es una en la que el anticuerpo contenido en la misma conserva esencialmente su estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica tras su almacenaje. Se encuentran disponibles en la técnica varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas y se revisan, por ejemplo, en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A., Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o es estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1 año o durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferentemente estable después de congelar (por ejemplo, a -70°C) y descongelar la formulación.

- 40 Un anticuerpo "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual del color y/o la claridad o medida por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaños.

- 45 Un anticuerpo "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína todavía conserva su actividad biológica, como se define más adelante. La estabilidad química se puede evaluar al detectar y cuantificar formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede involucrar la modificación de tamaño (por ejemplo, recorte) que se puede evaluar usando cromatografía de exclusión por tamaños, SDS-PAGE y/o ionización de desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga (por ejemplo, que sucede como un resultado de la desamidación) que se puede evaluar, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico.

- 50 Un anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente el 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica mostrada en el momento que se preparó la formulación, determinada, por ejemplo, en un ensayo de unión a antígeno. Otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos se desarrollan en el presente documento más adelante.

Por "isotónica" se entiende que la formulación de interés tiene en esencia la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas en general tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. Se puede medir la isotonicidad usando, por ejemplo, un osmómetro de tipo presión a vapor o congelación.

Un "poliol" es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferidos en el presente documento tienen un peso molecular que menor de aproximadamente 600 kD (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kD). Un "azúcar reductor" es uno que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones de metal o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductor" es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa. Los ejemplos de alcoholes de azúcar son manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol. En cuanto a ácidos de azúcar, estos incluyen L-gluconato y sales metálicas de los mismos. En los casos donde se desee que la formulación sea estable a la congelación-descongelación, el poliol preferentemente es uno que no se cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C) de modo que desestabiliza el anticuerpo en la formulación. Los azúcares no reductores incluyen, pero sin limitación, sacarosa y trehalosa.

Tal como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. El tampón de la presente invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0; preferentemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 6,5. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros tampones de ácido orgánico. En los casos donde se desee una formulación estable a la congelación-descongelación, el tampón preferentemente no es fosfato.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno para cuyo tratamiento el anticuerpo es eficaz. Una "enfermedad/trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir en esencia la acción bacteriana en la misma, facilitando de este modo, por ejemplo, la producción de una formulación multi-uso. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en donde los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservador más preferido en el presente documento es alcohol bencílico.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos, junto con al menos un portador o excipiente fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de agua, tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión y/o conservantes. Como se señaló antes, otros principios activos pueden (pero no necesariamente) incluirse en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento.

Un portador es una sustancia que se puede asociar con un anticuerpo antes de la administración a un paciente, a menudo para el propósito de controlar la estabilidad o biodisponibilidad del compuesto. Los portadores para usarse dentro de dichas formulaciones por lo general son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. Los portadores incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como albúmina de suero (por ejemplo, humano o bovino), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los portadores también incluyen materiales de soporte sólido tales como cuentas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, poliglicolato de poliácetato, poli(lactida-co-glicólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un portador puede portar los compuestos en una variedad de maneras, incluyendo unión covalente (ya sea directamente o vía un grupo enlazador), interacción no covalente o mezcla.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas para cualquier modo de administración adecuado, incluyendo, por ejemplo, administración ocular, intranasal, ótica, sublingual, transdérmica, tópica, oral, nasal, rectal o parenteral. En determinadas realizaciones, se prefieren composiciones en una forma adecuada para uso oral. Dichas formas incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. En otras realizaciones más, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse como un liofilizado. El término

parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar.

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención se puede administrar directamente al ojo por inyección al tejido ocular tal como inyecciones periorbitales, conjuntivales, "subtenon", intracamerales, intravítreas, intraoculares, subretinales, subconjuntivales, retrobulbares o intracanaliculares; por aplicación directa al ojo usando un catéter u otro dispositivo de colocación tal como una bola pequeña retinal, inserto intraocular, supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso por gotas oculares tópicas o ungüentos; o por un dispositivo de liberación lenta en el cul-de-sac o implantado adyacente a la esclera (transcleral) o en la esclera (intraescleral) o dentro del ojo. La inyección intracameral puede ser a través de la córnea en la cámara anterior para permitir al agente alcanzar la malla trabecular. La inyección intracanalicular puede estar en los canales colectores venosos drenando canal de Schlemm o en el canal de Schlemm.

15 Para administración oftálmica, un anticuerpo de la invención se puede combinar con conservadores oftalmológicamente aceptables, so-solventes, agentes tensioactivos, potenciadores de viscosidad, potenciadores de penetración, tampones, cloruro de sodio, o agua para formar una suspensión o solución acuosa, estéril u oftálmica. Se pueden empacar productos oftálmicos tópicos, por ejemplo, en forma de multidosis. Por lo tanto, se pueden requerir conservadores para prevenir contaminación microbiana durante el uso. Los conservadores adecuados incluyen: clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, edetato disódico, ácido sórbico, policuaternio-1, u otros agentes conocidos a aquellos conocidos en la técnica. Dichos conservadores típicamente se emplean a un nivel de 0,001 a 1,0% p/v. Las composiciones de dosis unitaria de la presente invención serán estériles, pero típicamente no conservadas. Por lo tanto, dichas composiciones por lo general no contendrán conservadores.

25 En determinadas realizaciones, las composiciones destinadas para administrarse tópicamente al ojo se formulan como gotas para ojos o ungüentos para ojos, en donde la cantidad total de anticuerpo será de aproximadamente 0,001 a 1,0% (p/p). Preferentemente, la cantidad de anticuerpo TNF α es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0% (p/p).

30 Se administrarán composiciones de la invención en ciertas circunstancias como soluciones para administración tópica. En general se prefieren soluciones acuosas, basándose en facilidad de formulación, así como una habilidad del paciente de administrar con facilidad dichas composiciones por medio de instalar una a dos gotas de las soluciones en los ojos afectados. Sin embargo, las composiciones también pueden ser suspensiones, geles viscosos o semi-viscosos, u otros tipos de composiciones sólidas o semi-sólidas.

35 Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y pueden contener uno o más agentes, tales como agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agente colorante, y agentes conservadores a fin de proporcionar preparaciones atractivas y apetecibles. Las tabletas contienen el principio activo en mezcla con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Dichos excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio), agentes granulantes y disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico), agentes de unión (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco). Las tabletas pueden ser no revestidas o se pueden revestir por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por tanto proporcionan una acción sostenida sobre un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

45 También se pueden presentar formulaciones para uso oral como cápsulas de gelatina dura en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite (por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva). Las suspensiones acuosas contienen el anticuerpo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen agentes de suspensión (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia); y agentes de dispersión y humectantes (por ejemplo, fosfatidas que ocurren de manera natural tal como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos tal como estearato de polioxietileno, productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga tal como heptadecaetileno-oxietanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tal como monooleato de sorbitán de polietileno). Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservadores, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Se pueden formular jarabes o elixires con agentes edulcorantes, tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa.

Dichas formulaciones también pueden comprender uno o más emolientes, conservadores, agentes saborizantes y/o agentes colorantes.

Se pueden formular suspensiones oleosas al suspender los principios activos en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de ajonjolí o aceite de coco) o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante tal como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes edulcorantes, tales como aquellos establecidos antes, y/o agentes saborizantes se pueden agregar para proporcionar preparaciones orales apetecibles. Dichas suspensiones se pueden conservar por la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Polvos y gránulos que se pueden dispersar adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más conservadores. Los agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión son ejemplificados por aquellos ya mencionados antes. Excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes, también pueden estar presentes.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete), un aceite mineral (por ejemplo, parafina líquida), o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsores adecuados incluyen gomas que ocurren de manera natural (por ejemplo, goma acacia y goma tragacanto), fosfatidas que ocurren de manera natural (por ejemplo, soya, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol), anhídridos (por ejemplo, monooleato de sorbitán), y productos de condensación de ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol con óxido de etileno (por ejemplo, monooleato de sorbitán de polioxietileno). Una emulsión también puede comprender uno o más agentes edulcorantes y/o saborizantes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como una suspensión acuosa o empalagosa inyectable estéril en donde el modulador, dependiendo del vehículo y concentración usados, se suspende o disuelve en el vehículo. Dicha composición se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes, humectantes y/o de suspensión adecuados tales como aquellos mencionados antes. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear son agua, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tal como ácido oleico en la preparación de composiciones inyectables, y adyuvantes tales como anestésicos locales, conservadores y/o agentes tampones se pueden disolver en el vehículo.

Se pueden formular composiciones farmacéuticas como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que afecta una liberación lenta de modulador después de la administración). Dichas formulaciones en general se pueden preparar usando tecnología bien conocida y se administran, por ejemplo, por implantación oral, rectal o subcutánea, o por implantación en el sitio diana deseado. Los portadores para usarse dentro de dichas formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación moduladora. La cantidad de un anticuerpo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende de, por ejemplo, el sitio de implantación, la velocidad y duración esperada de liberación y la naturaleza de la enfermedad/trastorno a tratarse o prevenirse.

Los anticuerpos anti-TNF α proporcionados en el presente documento se pueden administrar en una cantidad que logra una concentración en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, suero, CSF, fluido sinovial, linfa, fluido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unir de manera detectable a TNF y prevenir o inhibir enfermedades/trastornos mediados por TNF. Una dosis es considerada como efectiva si resulta en un beneficio discernible al paciente como se describe en el presente documento. Las dosis sistémicas preferidas varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día), con dosis orales por lo general siendo de aproximadamente 5-20 veces más que las dosis intravenosas. La cantidad de anticuerpo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo de administración particular. Las formas unitarias de dosificación en general contendrán entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un principio activo.

En determinadas realizaciones, composiciones farmacéuticas se pueden empacar para tratar condiciones responsivas a un anticuerpo dirigido a TNF. Las composiciones farmacéuticas empacadas pueden incluir un contenedor que mantiene una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo tal como se describe en el presente documento e instrucciones (por ejemplo, marca) indicando que la composición contenida se debe usar para tratar una enfermedad/trastorno responsivo a un anticuerpo después de la administración en el paciente.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden modificar químicamente. Los grupos modificadores preferidos son polímeros, por ejemplo, un polímero de polialqueno, polialquenileno o polioxialqueno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado. Dicho grupo efector puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*. Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), alcohol polivinílico) de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o derivados de los mismos. Los polímeros particulares que ocurren de manera natural incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos. El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500Da a 50000Da. Para aplicación local en donde el cuerpo está diseñado para penetrar tejido, un peso molecular preferido del polímero es aproximadamente 5000Da. La molécula de polímero se puede fijar al anticuerpo, por ejemplo, al extremo de terminal C de una cadena pesada de fragmento Fab vía un péptido de gozne covalentemente enlazado como se describe en el documento WO0194585. Con respecto a la fijación de porciones de PEG, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Después de la preparación del anticuerpo de interés como se describió antes, se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. El anticuerpo que se va a formular no se ha sometido a liofilización previa y la formulación de interés en el presente documento es una formulación acuosa. Preferentemente, el anticuerpo en la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se determina al considerar los volúmenes y modo(s) de administración de dosis deseada, por ejemplo. De aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml y lo más preferentemente de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml es una concentración de anticuerpo ejemplar en la formulación.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo en una solución regulada con pH como se describió antes. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la isotonicidad deseada de la formulación.

Un poliol, que actúa como un tonificante y puede estabilizar al anticuerpo, se incluye en la formulación. En realizaciones preferidas, la formulación no contiene una cantidad tonificante de una sal tal como cloruro de sodio, ya que esto puede causar que el anticuerpo se precipite y/o puede resultar en oxidación a pH bajo. En realizaciones preferidas, el poliol es un azúcar no reductor, tal como sacarosa o trehalosa. El poliol se agrega a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. Preferentemente, la formulación acuosa es isotónica, en cuyo caso concentraciones adecuadas del poliol en la formulación están en el intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% p/v, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% p/v, por ejemplo. Sin embargo, también pueden ser adecuadas las formulaciones hipertonías o hipotónicas. La cantidad de poliol agregado también puede alterarse con respecto al peso molecular del poliol. Por ejemplo, se puede agregar una cantidad menor de monosacárido (por ejemplo, manitol), en comparación con un disacárido (tal como trehalosa).

También se puede agregar un agente tensioactivo a la formulación de anticuerpo. Agentes tensioactivos ejemplares incluyen agentes tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). Típicamente, la cantidad de agente tensioactivo agregado es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado/derivado de anticuerpo y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el agente tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%, preferentemente de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2% y lo más preferentemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%.

En una realización, una formulación contiene los agentes identificados antes (es decir, anticuerpo, tampón, poliol y agente tensioactivo) y en esencia está libre de uno o más conservadores, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y Cl de bencetonio. En otra realización, se puede incluir un conservador en la formulación, en particular en donde la formulación es una formulación de multidosis. La concentración de conservador puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, lo más preferentemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%. Uno o más portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª edición, Osol, A. Ed. (2006) se pueden incluir en la formulación siempre y cuando no afectan de manera adversa las características deseadas de la formulación. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a excipientes en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes tampones adicionales; co-solventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tal como EDTA; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína de Zn); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tal como sodio.

Las formulaciones destinadas a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de, o después de, la preparación de la formulación.

La formulación se administra a un mamífero que necesita tratamiento con el anticuerpo, preferentemente un humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una bola o por infusión continua sobre un periodo de tiempo, por rutas intramusculares, intraperitoneales, intracerebroespinales, subcutáneas, intra-articulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o inhalación, u otras rutas como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, la formulación se administra al mamífero por administración intravenosa. Para dicho propósito, la formulación se puede inyectar usando una jeringa o vía una línea IV, por ejemplo.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la condición a ser tratada, la gravedad y curso de la condición, ya sea que el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, el tipo de anticuerpo usado, y la discreción del médico. El anticuerpo se administra de manera adecuada para el paciente en una sola ocasión o sobre una serie de tratamientos y se puede administrar como el único tratamiento o en conjunto con otros fármacos o terapias útiles para tratar la condición en cuestión.

Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrado estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente ya sea por una o más administraciones, con el intervalo típico de anticuerpo usado siendo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrado diariamente, por ejemplo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitorea con facilidad por técnicas convencionales.

En determinadas realizaciones, composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-TNF α de la invención se administran a un paciente que sufre de un trastorno mediado por TNF.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un contenedor que sostiene la formulación farmacéutica acuosa de la presente invención y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos y jeringas. El contenedor puede estar formado de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Un contenedor ejemplar es un frasco de vidrio de un solo uso de 3-20 cc. Como alternativa, para una formulación de multidosis, el contenedor puede ser un frasco de vidrio de 3-100 cc. El contenedor mantiene la formulación y la etiqueta en, o asociado con, el contenedor puede indicar direcciones para usarse. El artículo de fabricación además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular usados en el presente documento incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional.

A lo largo de los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos, a menos que se indique lo contrario.

Materiales y métodos generales

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (en especial, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándar de preparación de polipéptido. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

Mediciones de termoestabilidad

Se obtuvieron espectros de transformación IR de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR) para varias cadenas individuales y moléculas de seguimiento usando la célula FT-IR Bio-ATR en un Tensor Bruker. Las moléculas se concentraron hasta 3 mg/ml y se dializaron durante la noche a 4°C contra PBS, pH 6,5 y el flujo tampón fue recolectado como en blanco. Los perfiles de desnaturalización fueron obtenidos mediante la exposición térmica de las moléculas con un intervalo amplio de temperaturas en pasos de 5°C (25 a 95°C). Se realizaron todas las manipulaciones de espectro usando el software OPUS. El tampón principal y antecedente atmosférico transitorio

(CO₂ y H₂O) se restaron del espectro de proteína. Entonces, se corrigió el espectro de proteína resultante respecto del basal y se determinó el espectro de proteína amida I a partir del ancho del pico más amplio en la región esperada. Se obtuvieron segundos espectros derivados del espectro de banda de amida I usando una tercera función polinomial de tercer grado con una función suavizante. Se estimaron cambios en estructura de proteína mediante análisis derivado segundo de amida I usando una curva de calibración lineal para los cálculos de curva iniciales suponiendo 0% de desnaturalización para las 3 mediciones menores y 100% de desnaturalización para las 3 mediciones mayores. Se usaron los perfiles de desnaturalización a puntos medios aproximados de las transiciones de desdoblado térmicas (TM) para cada variante aplicando el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Mediciones de solubilidad

La solubilidad relativa de varias moléculas scFv se midió después de la agregación de proteína potenciadora y precipitación en presencia de sulfato de amonio. Se agregó sulfato de amonio a la proteína en soluciones acuosas para dar incrementos de un 5% de saturación en la mezcla final de sal-proteína. La precipitación en el intervalo dinámico se determinó empíricamente y los intervalos de saturación reducidos en este intervalo a 2,5% de saturación de intervalos en la mezcla final. Después de adición de sulfato de amonio, las muestras se mezclaron con cuidado y se centrifugaron 30 minutos a 6000rpm. La proteína restante en sobrenadantes se recuperó para cada porcentaje de sulfato de amonio de saturación. Se determinaron curvas de solubilidad al medir la concentración de proteína en el sobrenadante usando NanoDropTM 1000 espectrofotómetro. Se normalizaron las mediciones de proteína soluble restante en sobrenadantes y se usaron para estimar puntos medios de solubilidad relativa para cada variante aplicando el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Prueba de estabilidad a plazo corto

Se examinó la proteína después de dos semanas de incubación a 40°C para agregados solubles y productos de degradación. Las proteínas con una concentración de 10 mg/ml se dializaron durante la noche a 4°C contra PBS con un intervalo amplio de pH (3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,5). La proteína de control con la misma concentración en PBS tampón estándar (pH 6,5) se almacenó a -80°C durante el periodo de 2 semanas. La determinación de bandas de degradación por SDS-PAGE se hizo a t=0 y t=14d puntos de tiempo y los agregados solubles fueron evaluados en la SEC-HPLC. La determinación de actividad restante después de 2 semanas a 40°C se hizo usando Biacore.

EJEMPLO 1

Optimización de anticuerpo scFv anti-TNF α , 34rFW1.4, para reducir agregación

El anticuerpo 34rFW1.4 muestra una propensión a la agregación dependiente del pH en solución. El anticuerpo 578rFW1.4 (véase la solicitud internacional WO2009155724), que comparte la misma estructura que 34rFW1.4, no muestra una propensión a la agregación. Se generaron modelos de homología para identificar restos potenciales en 34rFW1.4 que se podrían modificar para reducir su propensión a la agregación de la siguiente manera.

Se usaron secuencias de dominio variable para construir modelos de homología del anticuerpo 34rFW1.4 y el anticuerpo 578rFW1.4. Para generar los modelos, se usaron búsquedas basadas en el algoritmo BLAST para identificar estructuras de plantilla para las secuencias de dominio variable de cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH) para cada anticuerpo por separado. Se usó BLOSUM80 (matriz para menos alineaciones divergentes) como matriz para las alineaciones debido a la alta conservación de las regiones de estructura en anticuerpos. Se seleccionaron las plantillas individuales para cada cadena (VL/VH) que mostraron más de un 70% de identidad respecto de las secuencias de búsqueda.

El programa MODELER del software Discovery Studio versión 2.5.5 (DS 2.5.5) (Accelrys, Inc., San Diego, CA) se usó para generar 100 modelos de scFv basándose en las plantillas de dominio variable identificado. La alineación de las secuencias de anticuerpo de referencia a modelarse con estructuras de plantilla se usó como datos de entrada. Se prepararon 100 modelos que contienen todos los átomos de no hidrógeno. Se seleccionaron las mejores estructuras de modelo basándose en una calificación de energía física de PDF (función de densidad de probabilidad). La orientación relativa de dominio VH y VL se ajustó para igualar aquella de la estructura de plantilla de dominio variable con la homología más alta a ambas secuencias modeladas (VL y VH). Se eliminaron conformaciones alternas en el modelo, se agregaron terminales, y se agregaron átomos de cadena lateral faltantes. Se aplicó campo de fuerza CHARMM a los modelos scFv y se sometieron a 2000 ciclos de minimización de energía usando un gradiente RMS de 0,01 y el "born" generalizado con volumen molecular (GBMV) como modelo de solvente implícito.

Se realizaron cálculos de ionización de proteína y resto pK para cada uno de los anticuerpos. Se hicieron los cálculos usando la implementación de protocolo incluido en Discovery Studio versión 2.5.5 (DS 2.5.5), basándose en la teoría desarrollada por Bashford y Karplus, 1991. Los resultados de ionización de proteína y cálculos de resto pK se compararon para las dos moléculas en términos de pK_{1/2} de las cadenas laterales y curvas de titulación de cada

resto tituable, incluyendo Asp, Glu, Arg, Lys, His, Tyr, Cys, los restos de terminal N y terminal C de los anticuerpos.

Se aplicó campo de fuerza CHARMM a los modelos scFv y se protonaron a pH 7,4, las curvas de titulación y los pK de los restos individuales se calcularon a partir del intervalo de pH 2 a pH 14 usando los pasos de pH de 0,2. Dos restos de Lys conservados en las posiciones 47 y 50 en la cadena ligera del anticuerpo 34rFW1.4 difirieron en comparación con el Lys en aquellas posiciones en el 34rFW1.4 (véase figura 1).

Introducción de sustituciones preferidas

Se usó el software Discovery Studio para conducir simulaciones dinámicas moleculares para predecir mutaciones que mejoran la afinidad de interacción entre VL y VH, así previniendo que los dominios se separen y formando oligómeros y de agregados de orden más alto. La estabilidad de la interfaz de VL/VH del anticuerpo 34rFW1.4 se estimó como términos de energía como energía libre G. Una adaptación de protocolo CHARMM (también incluido en DS 2.5.5) se usó para calcular la diferencia de energía entre el complejo de heterodímero scFv entero y la suma de las energías de cada uno de los dominios variables individuales. Los cálculos se hicieron en el contexto de un método de solvente implícito usando el Born Generalizado con integración de volumen molecular (GBMV). Las energías de ambos dominios y el complejo se calcularon, y la salida se determinó como la diferencia en energía entre el complejo y la suma de los dominios individuales de acuerdo con el siguiente cálculo: $G_{\text{interfaz}} = G(a) - G(b) - G(c)$, en donde G(a) es la energía del anticuerpo, G(b) es la energía de la VL, y G(c) es la energía de la VH.

Se seleccionó arginina (R) como una sustitución de resto posible para la lisina (K) en las posiciones 47 y 50, ya que el valor de pKa de cadena lateral para R (12,5) es mayor que pKa de K (10,5). Se generaron mutantes K47R y K50R al reemplazar K por R individualmente en las posiciones respectivas. 2000 ciclos de minimización de energía se realizaron para restos 10 Angstroms o más cercano al área aproximadamente la mutación para permitir a las nuevas moléculas de modelo adaptarse al cambio. El modelo de solvente implícito para estas rondas de minimización de energía fue GBMV. G delta promedio predicho para los mutantes fue -94 kcal/mol. Por lo tanto, la contribución de las mutaciones fue estimada a 4 kcal/mol en comparación con el anticuerpo scFv anti-TNF parental.

Ejemplo 2

Análisis de estabilidad del anticuerpo 34rFW1.4 optimizado

Se generaron el mutante K50R y el mutante K47R en el anticuerpo 34rFW1.4 (que se describe en la solicitud internacional co-pendiente No. PCT/CH2009/000219, presentada el 25 de junio de 2009, los contenidos de la cual se incorporan a la presente por referencia en su totalidad). Otro mutante de 34rFW1.4 teniendo sustituciones adicionales para reducir su inmunogenicidad *in vivo* se preparó de acuerdo con los métodos descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 12/973.968. En particular, el tercer mutante, designado 34rFW1.4_VLK50R_DHP, contuvo una serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), una treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo), y una treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo). Estudios de estabilidad de los anticuerpos 34rFW1.4 origen y mutantes se realizaron en condiciones aceleradas de la siguiente manera.

El anticuerpo 34rFW1.4, mutante 34rFW1.4_VL_K50R, y 34rFW1.4_VLK50R_DHP se concentraron hasta 20, 40 y 60 mg/ml en solución salina regulada con fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6,5) formulación e incubada 2 semanas a 40°C. Los anticuerpos 34rFW1.4 y 34rFW1.4_K47R se concentraron hasta 20 y 60 mg/ml en solución salina regulada con fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6,5) formulación e incubada 2 semanas a 40°C. Se analizaron muestras antes y después de 14 días de incubación para degradación usando 12,5% de electroforesis de gel de dodecilsulfato – poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Se usó cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión de tamaño (SE-HPLC) para determinar el contenido de monómero y agregados solubles de las muestras antes y después del periodo de incubación. Los monómeros fueron resueltos de especies no monoméricas en una columna TSKgel Super SW2000 (TOSOH Bioscience) y el porcentaje de proteína monomérica se calculó como el área del pico de monómero dividido por el área total de todos los picos de producto. Los resultados de los estudios para 34rFW1.4 y 34rFW1.4_VLK50R_DHP se muestran en las figuras 2A-B, 3A-B y 4A-B, respectivamente. Los resultados para 34rFW1.4_VL_K50R se muestran en las figuras 5B, 6B y 7B. Estos experimentos demostraron que 34rFW1.4_VLK50R_DHP tuvo una propensión a la agregación reducida en comparación con 34rFW1.4. El mutante 34rFW1.4_K47R también demostró dicha reducción como se muestra en las figuras 8B y 9B.

Además, se compararon la estabilidad térmica y afinidades de unión de los anticuerpos 34rFW1.4 y 34rFW1.4_VLK50R_DHP. Los resultados demostraron que las mutaciones hechas para generar el anticuerpo 34rFW1.4_VLK50R_DHP no afectaron la estabilidad o actividad de unión con respecto al anticuerpo 34rFW1.4 origen.

Listado de secuencias

	<110> ESBATech, an Alcon Biomedical Research Unit LLC Borras, Leonardo Urech, David
5	<120> ANTICUERPOS ESTABLES Y SOLUBLES
	<130> 3921 US
10	<160> 18
	<170> PatentIn versión 3.4
15	<210> 1 <211> 231 <212> PRT <213> Artificial
20	<220> <223> Péptido sintético
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (24)..(73)
25	<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (89)..(138)
30	<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (171)..(220)
35	<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
40	<400> 1

ES 2 660 613 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

5 <210>2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 660 613 T3

<400>2

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65     70     75     80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
85     90     95

Gly Asp Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

```

100

105

110

- 5 <210>3
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Péptido sintético
- 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(75)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (90)..(139)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (172)..(221)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 30 <400>3

ES 2 660 613 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210>4
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(75)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (90)..(139)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (172)..(221)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

20 <400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala

ES 2 660 613 T3

65					70						75					80
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85					90						95	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				100					105					110		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				115					120					125		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser
				130					135				140			
Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	
145					150					155					160	
Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				165					170						175	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				180					185					190		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				195					200					205		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln
				210					215				220			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
225					230											

<210>5
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 5

ES 2 660 613 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Arg Ser
 20 25 30
 Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr Ala Asn
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>6
 <211>5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210>7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210>8
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 660 613 T3

	<220>
	<223> Péptido sintético
5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (24)..(73) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
10	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (89)..(138) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
15	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (171)..(220) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (277)..(326) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
25	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (341)..(390) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
30	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (423)..(483) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
35	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (423)..(483) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
40	<400> 8

ES 2 660 613 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

ES 2 660 613 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

ES 2 660 613 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

- 5 <210>9
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Péptido sintético
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(73)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(138)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (171)..(220)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (277)..(326)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (341)..(390)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (423)..(483)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 45 <400> 9

ES 2 660 613 T3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

ES 2 660 613 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270
 Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

ES 2 660 613 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335
 Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480
 Val Ser Ser

<210> 10
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 10

ES 2 660 613 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
 20 25 30
 Ile Trp Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
 85 90 95
 Gly Asp Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val
 130 135 140
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 165 170 175
 Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro
 180 185 190
 Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr
 195 200 205
 Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
 225 230 235 240
 Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

ES 2 660 613 T3

	<210> 11
	<211> 231
	<212> PRT
5	<213> Artificial
	<220>
	<223> Péptido sintético
10	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (24)..(73)
	<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
15	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (89)..(138)
	<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
20	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (171)..(220)
25	<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
	<400> 11

ES 2 660 613 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

<210> 12
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(73)

<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(138)

<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (171)..(220)

<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

15

<400> 12

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

20

ES 2 660 613 T3

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 13
<211> 231
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(73)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(138)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (171)..(220)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<400> 13

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
65 70 75 80

ES 2 660 613 T3

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

<210> 14
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 14

ES 2 660 613 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
 20 25 30
 Ile Trp Met Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
 85 90 95
 Gly Asp Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 15
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(73)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(138)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (171)..(220)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (277)..(326)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (341)..(390)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (423)..(483)

5 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

<400> 15

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

ES 2 660 613 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
 65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

ES 2 660 613 T3

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
420 425 430

Xaa
435 440 445

Xaa
450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

- 5 <210> 16
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Péptido sintético
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(73)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(138)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (171)..(220)
<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (277)..(326)

<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (341)..(390)

<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (423)..(483)

<223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Puede estar presentes de al menos uno hasta 50 aminoácidos

15

<400> 16

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

ES 2 660 613 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

ES 2 660 613 T3

465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 17
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 17

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
85 90 95

Gly Asp Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr
145 150 155 160

Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro
180 185 190

Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr
195 200 205

ES 2 660 613 T3

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
 225 230 235 240

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 18
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 18

ES 2 660 613 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
 20 25 30
 Ile Trp Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
 85 90 95
 Gly Asp Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val
 130 135 140
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 165 170 175
 Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro
 180 185 190
 Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr
 195 200 205
 Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
 225 230 235 240
 Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a TNF α que comprende:
 - a) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 14; y
 - b) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que además tiene un enlazador que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 17.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TNF α .
- 15 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad mediada por TNF α es un trastorno ocular seleccionado entre el grupo que consiste en uveítis, enfermedad de Behçet, retinitis, ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjögren, neuropatía diabética, escleritis, degeneración macular relacionada con la edad y queratitis.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición farmacéutica es para su administración mediante administración ocular, intranasal, ótica, sublingual, transdérmica, tópica, oral, nasal, rectal o parenteral.
- 20 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición farmacéutica es para su administración en una sola o en dosis divididas que comprenden de 0,1 a 100 mg del anticuerpo.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad mediada por TNF α es uveítis y la composición farmacéutica se administra tópicamente a un ojo del sujeto.
- 25 10. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.
11. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 11.
13. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv monocatenario (scFv), un fragmento Fv o un anticuerpo lineal.
- 30 14. Una molécula bivalente o biespecífica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1.

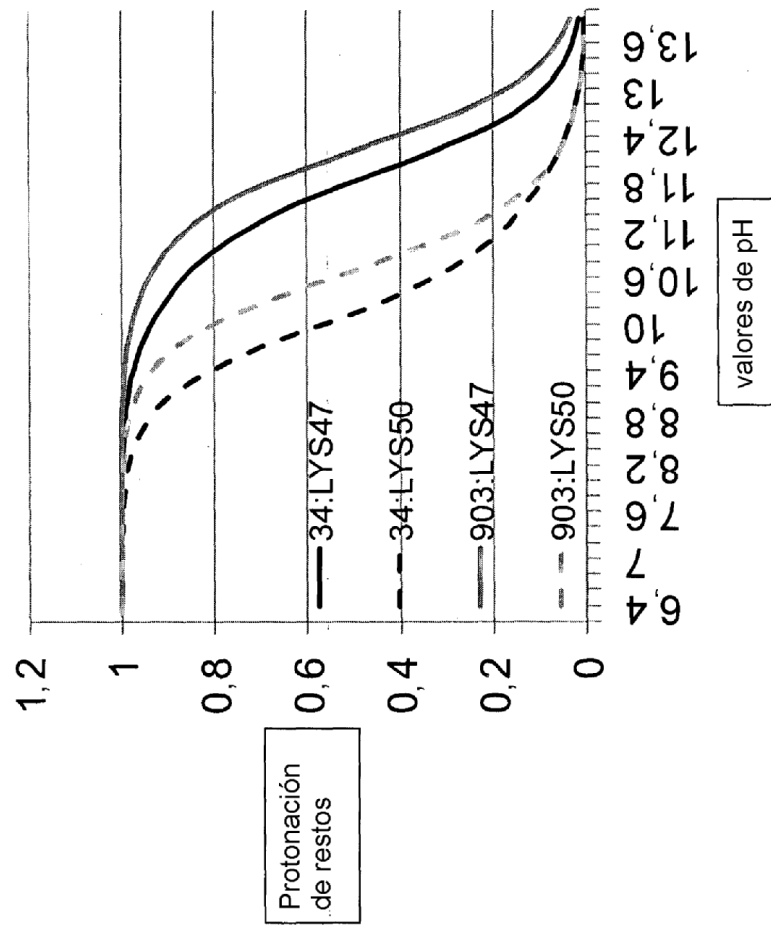


FIG. 1

34rFW1.4_VLK50R_DHP

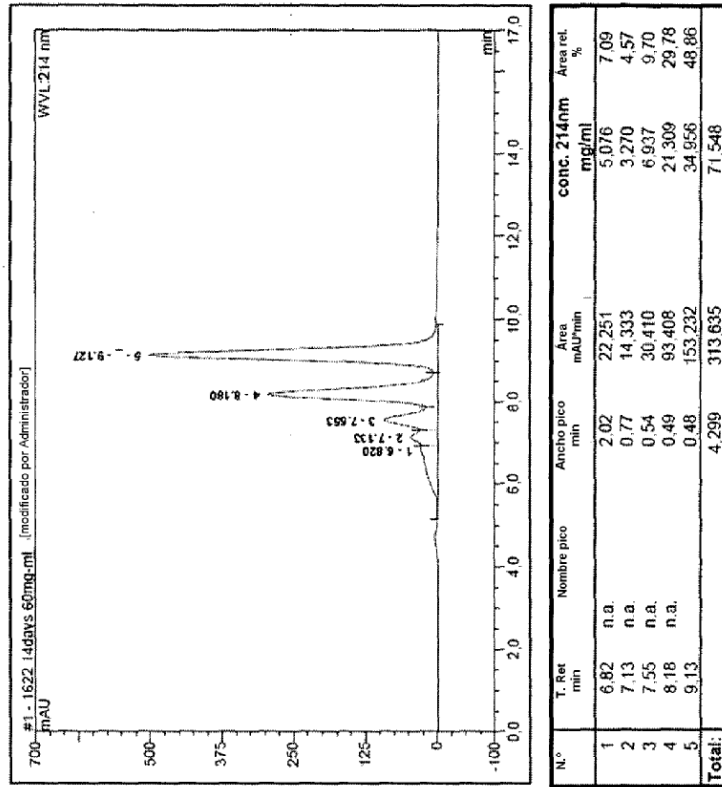


FIG. 2B

34rFW1.4

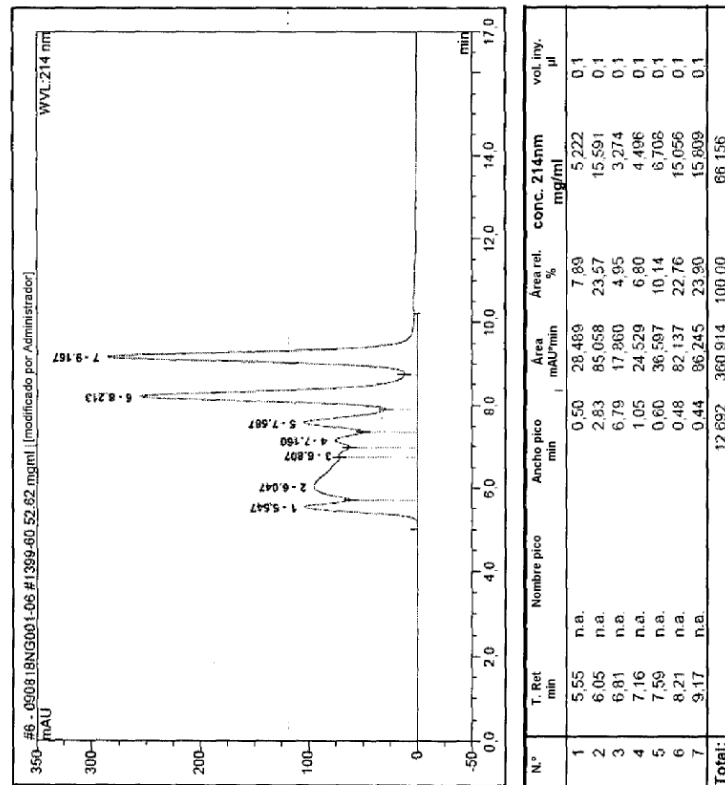


FIG. 2A

34rFW1.4_VLK50R_DHP

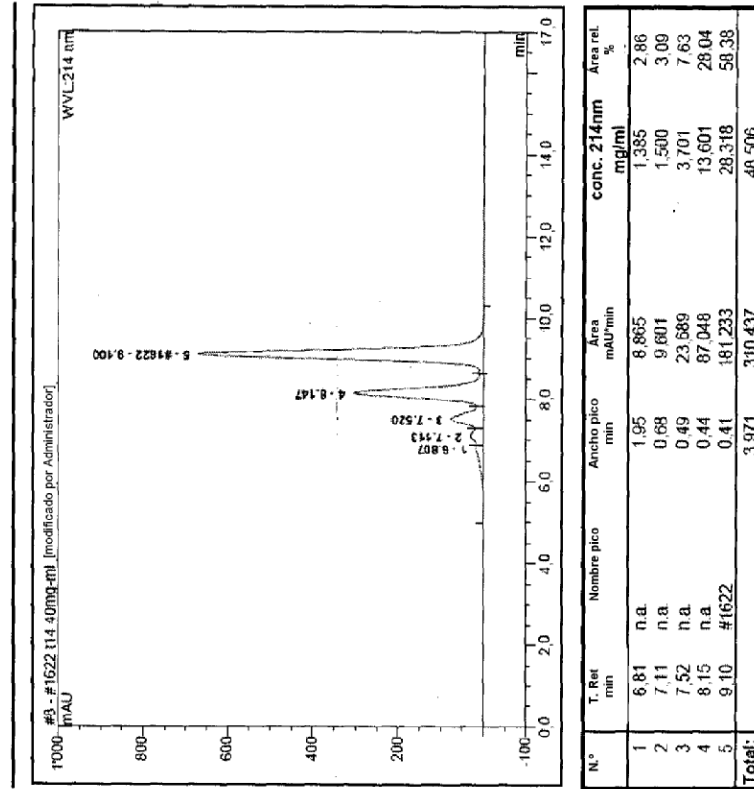


FIG. 3B

34rFW1.4

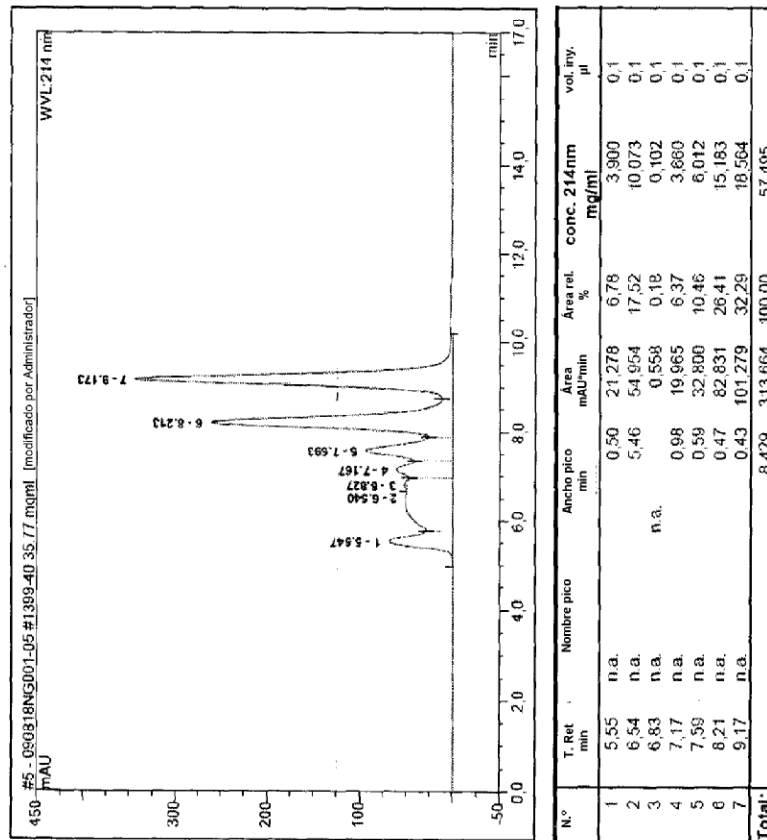


FIG. 3A

34rFW1.4_VLK50R_DHP

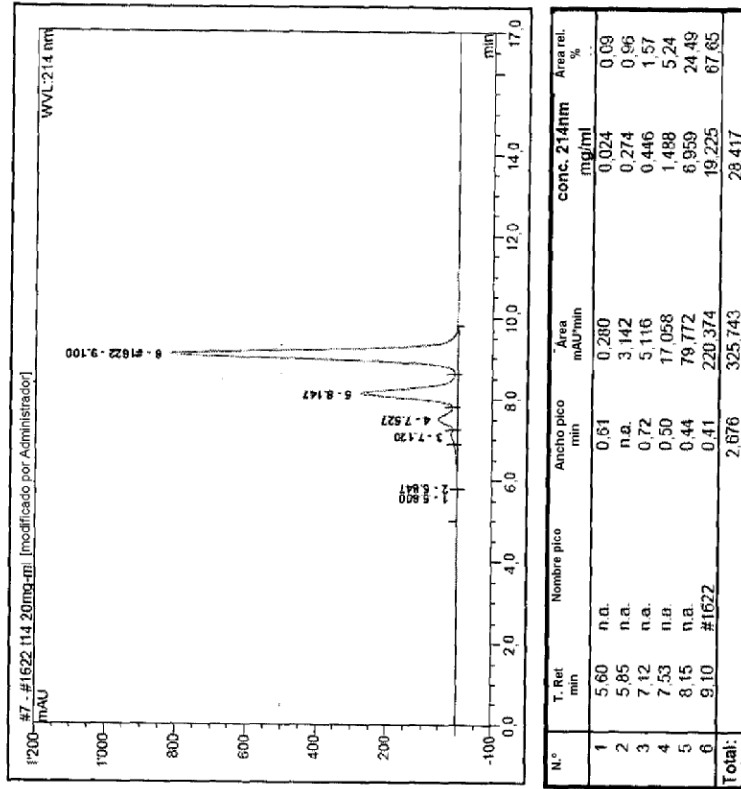


FIG. 4B

34rFW1.4

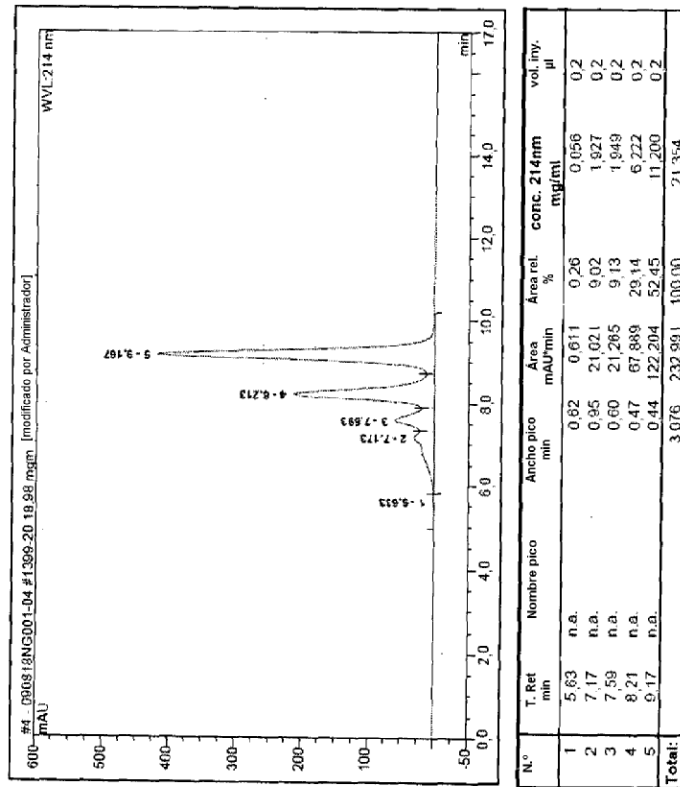


FIG. 4A

34rFW1.4

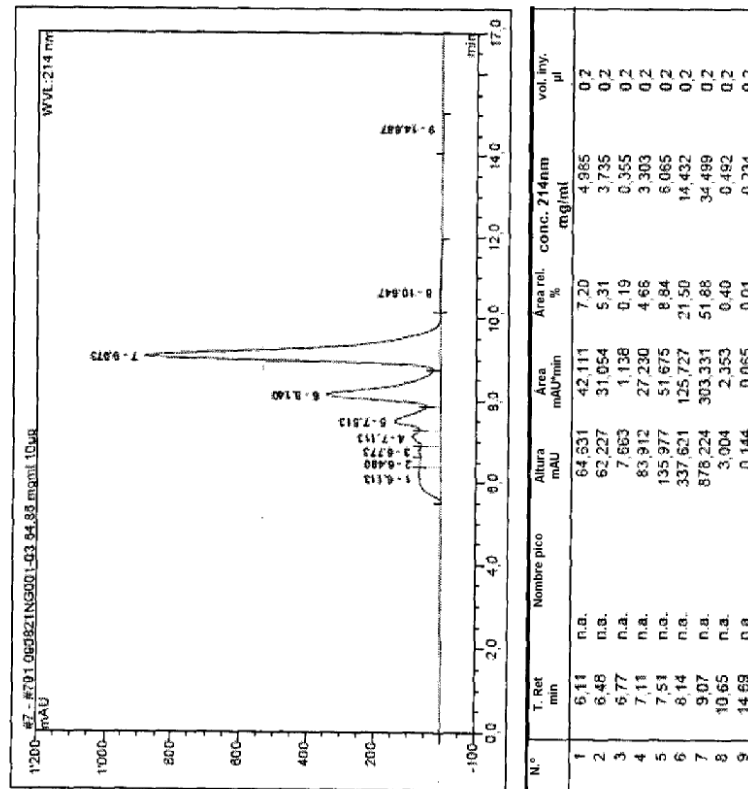


FIG. 5A

34rFW1.4_K50R

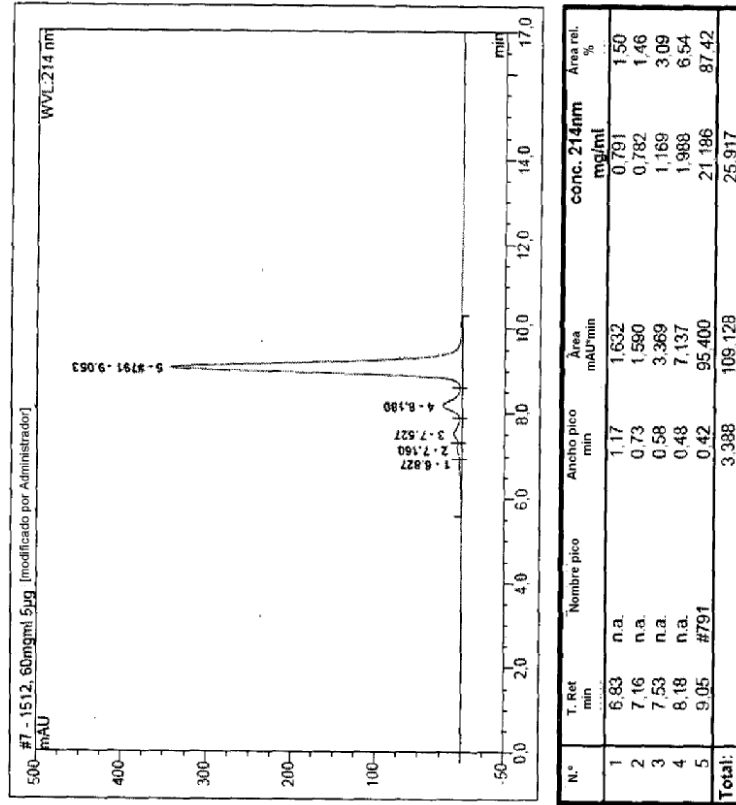
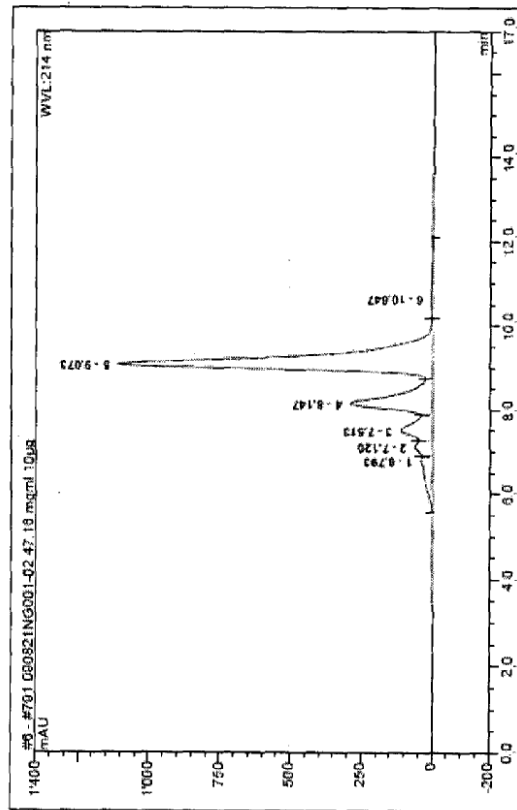


FIG. 5B

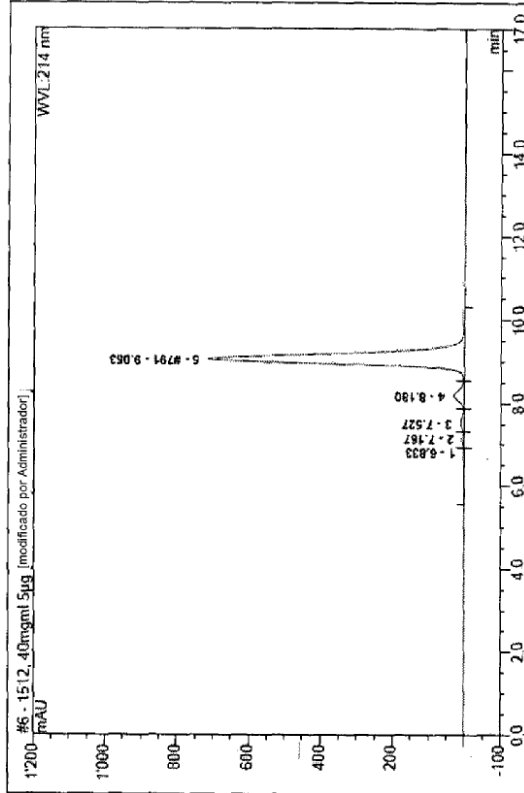
34rFW1.4



N°	T. Ret min	Nombre pico	Altura mAU	Area mAU*min	Area rel. %	conc. 214nm mg/ml	vol. iny. µl
1	6.79	n.a.	41.657	29.561	4.94	2.592	0.2
2	7.12	n.a.	61.900	20.143	3.36	1.818	0.2
3	7.51	n.a.	112.576	44.293	7.39	3.800	0.2
4	8.15	n.a.	291.178	110.556	18.45	9.239	0.2
5	9.07	n.a.	1110.654	388.532	64.84	32.054	0.2
6	10.65	n.a.	6.065	6.153	1.03	0.670	0.2

FIG. 6A

K50R



N°	T. Ret min	Nombre pico	Ancho pico min	Area mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Area rel. %
1	6.83	n.a.	1.23	1.405	0.475	0.65
2	7.17	n.a.	0.76	1.878	0.541	0.87
3	7.53	n.a.	0.63	4.500	0.906	2.08
4	8.18	n.a.	0.49	9.943	1.663	4.60
5	9.05	#791	0.42	198.228	27.873	91.79
Total:			3.538	215.954	31.457	

FIG. 6B

34rFW1.4

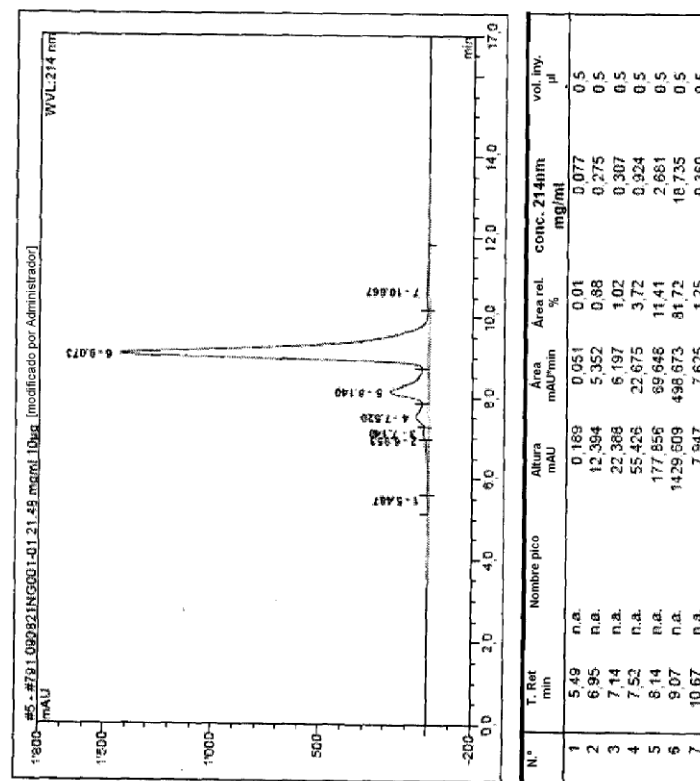


FIG. 7A

34rFW1.4_K50R

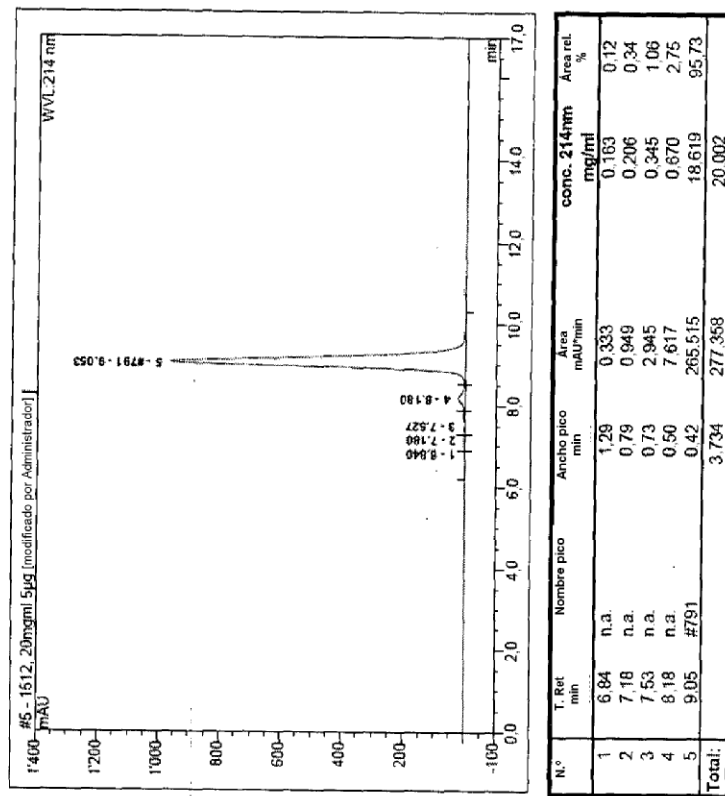


FIG. 7B

34rFW1.4

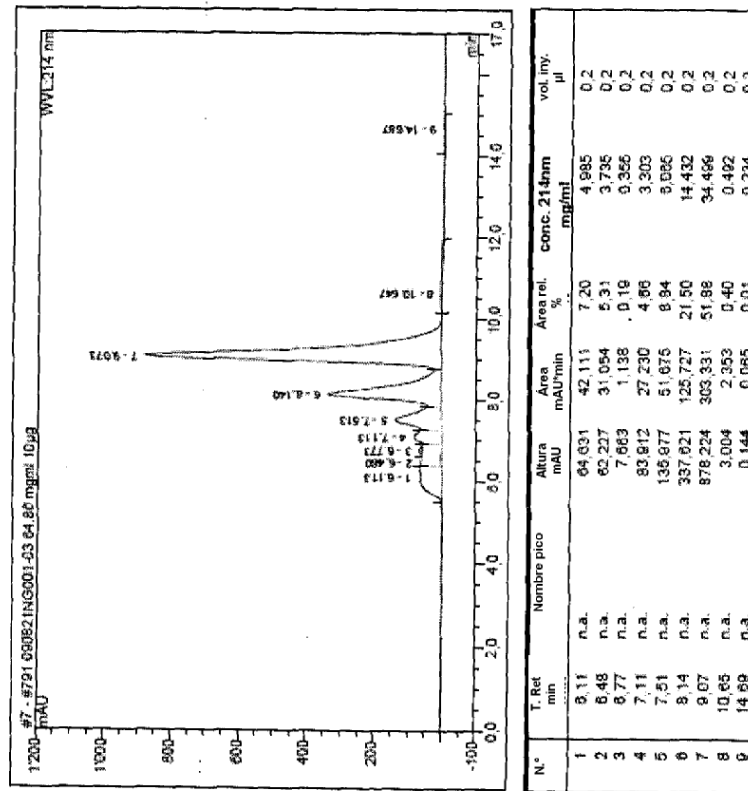


FIG. 8A

34rFW1.4_K47R

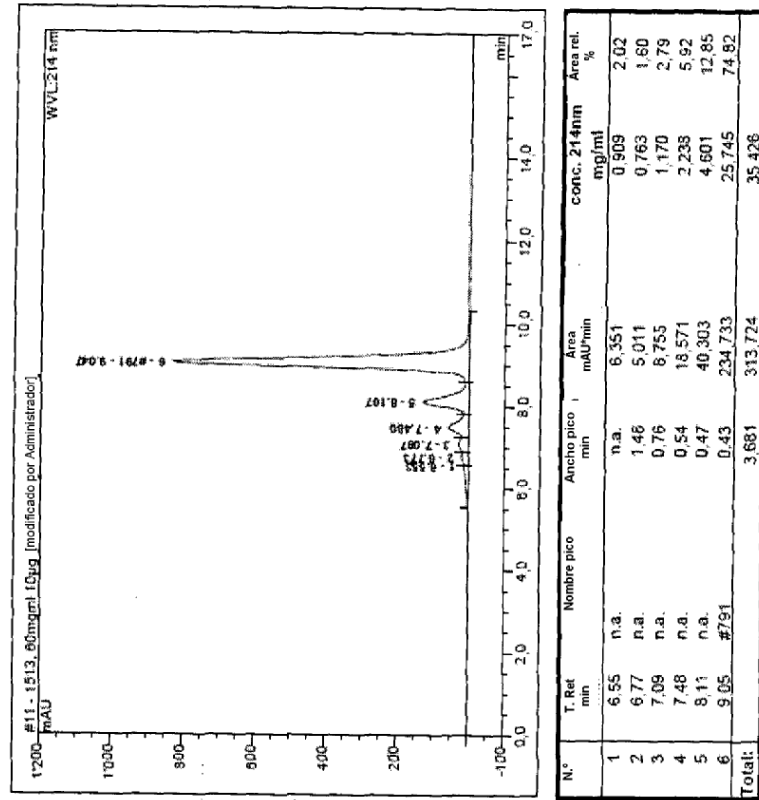


FIG. 8B

34rFW1.4

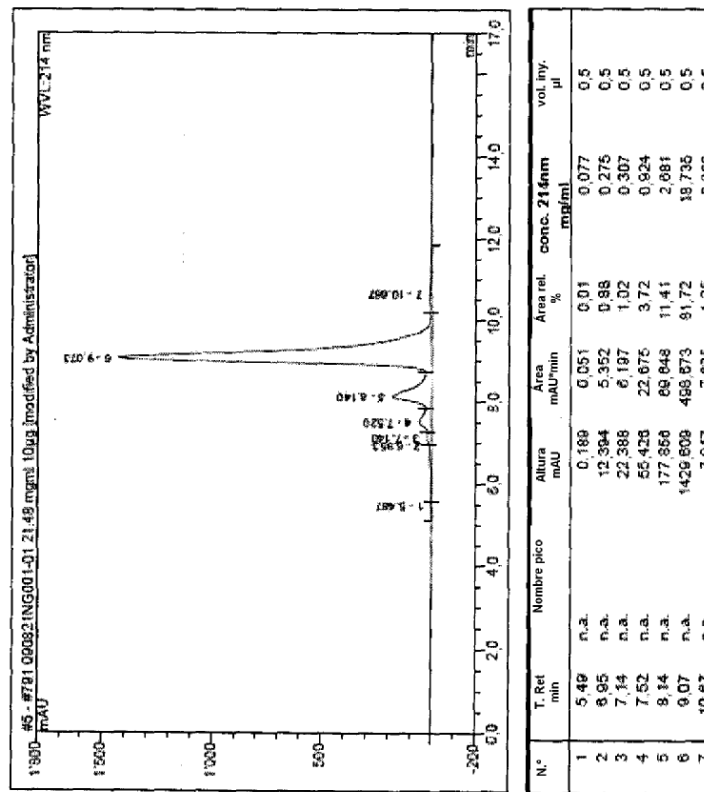


FIG. 9A

34rFW1.4_K47R

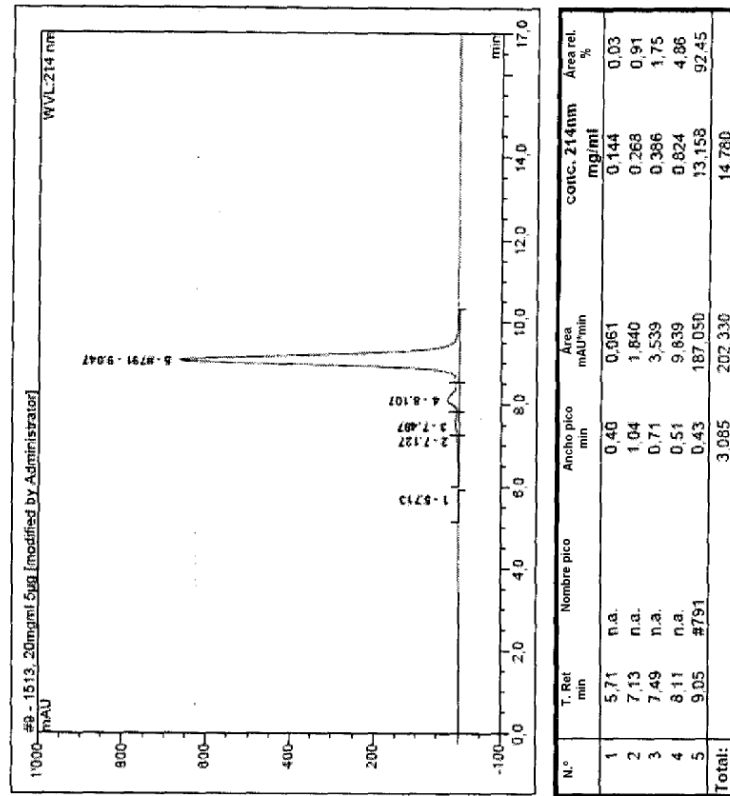


FIG. 9B