

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: Centocor, Inc.

Dirección: 200 Great Valley Parkway

Nacionalidad o Domicilio: Malvern,
Pennsylvania 19355, Estados Unidos

Lugar de Constitución: Pennsylvania

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.779.452T.P 68228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER ANEXOS

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US01/24784

Fecha Agosto 7, 2001

Publicación Internacional No. WO 02/12501 A2

Fecha Febrero 14, 2002

6 TÍTULO (54) ANTICUERPOS INTEGRIN ANTI-DUALES, COMPOSICIONES, MÉTODOS
Y USOS.

6 Clasificación Internacional (51)

C 12 N61K 39/395

7 Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

Estados Unidos

Estados Unidos

(32) Fecha

Agosto 7, 2000

Agosto 1, 2001

(31) Número de Solicitud

60/223.363

09/920.267

9 Comprobante de pag No. 03 - 7.199

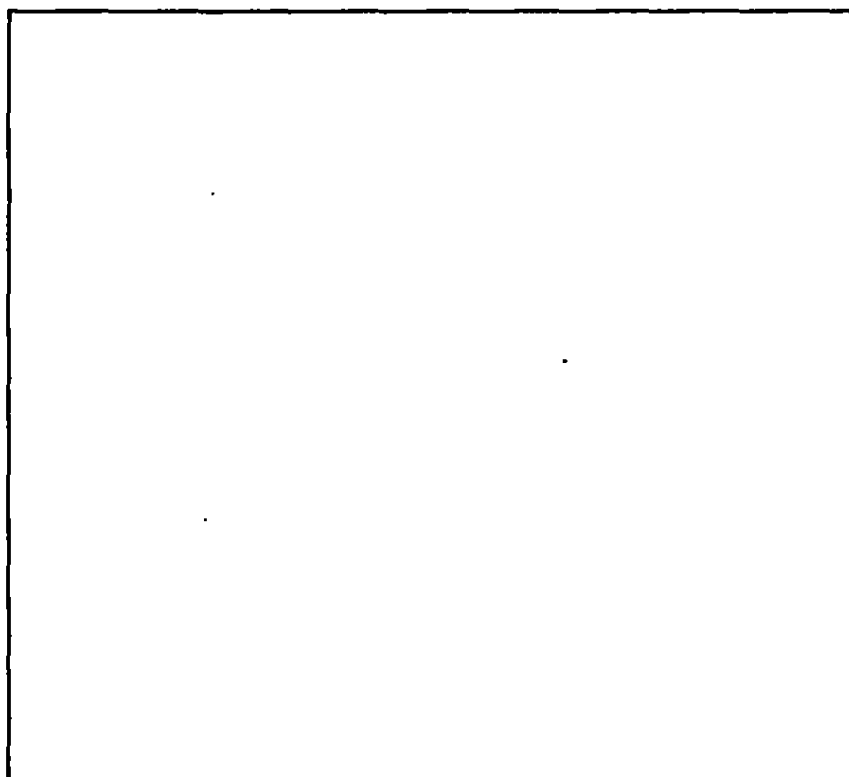
Fecha Febrero 4, 2003

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuera el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 ¿ Ilcito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: 

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 69.228

As. 2529/PCT

2529

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 7,199
FECHA : FEBRERO 4 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9934069	03/02/2003	12,065,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.

SOM: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

3

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **JILL GILES-KOMAR /**
(Downingtown, Pennsylvania 19335, Estados Unidos de América);
- 2.) **GEORGE HEAVNER /**
(Malvern, Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América);
- 3.) **LINDA SNYDER /**
(Pottstown, Pennsylvania 19465, Estados Unidos de América);
- 4.) **MOHIT TRIKHA /**
(Paoli, Pennsylvania 19301, Estados Unidos de América).

4

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
CENTOCOR, INC., sociedad constituida de
conformidad con las leyes del estado de Pennsylvania,
domiciliada en 200 Great Valley Parkway, Malvern,
Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América, el
otorgamiento de Patente para la invención titulada
**"ANTICUERPOS INTEGRIN ANTI-DUALES,
COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS "**.

Clase: C 12


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen
T.P . 68.228

APOSTILLE

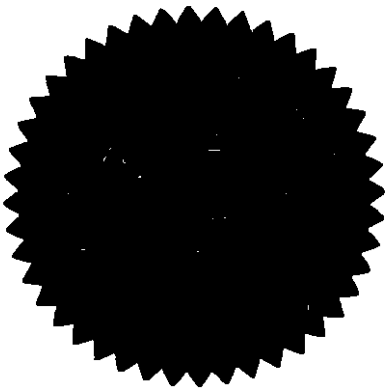
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
CHRISTINA A CLICKNER
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
CHRISTINA A CLICKNER, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 13TH DAY OF FEBRUARY 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A166339
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

John E McCormac



6
CEN 186/249 COL(L)

CERTIFICATION

I hereby certify that I have compared the attached document with the original, and that such said document is a true copy of the original Assignment document as filed and recorded in the U.S. Patent Office in connection with USSN 09/920,267 filed AUGUST 1, 2001.



Christina A. Clickner
(Notary Public of New Jersey)
My Commission Expires:
March 2, 2005



NOVEMBER 21, 2001

JOHNSON & JOHNSON
PHILIP S. JOHNSON, ESQ.
CHIEF PATENT COUNSEL
ONE JOHNSON & JOHNSON PLAZA
NEW BRUNSWICK, NJ 08933-7003

RECEIVED

PTAS

NOV 30 2001

J & J PAT. DKT. SECTION

Under Secretary of Commerce For Intellectual Property and
Director of the United States Patent and Trademark Office
Washington, DC 20231
www.uspto.gov

CEN249



101842409A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 08/31/2001

REEL/FRAME: 012149/0235
NUMBER OF PAGES: 7

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
GILES-KOMAR, JILL

DOC DATE: 07/31/2001

ASSIGNOR:
HEAVNER, GEORGE

DOC DATE: 07/31/2001

ASSIGNOR:
SNYDER, LINDA

DOC DATE: 08/01/2001

ASSIGNOR:
TRIKHA, MOHIT

DOC DATE: 07/31/2001

ASSIGNEE:
CENTOCOR, INC.
200 GREAT VALLEY PARKWAY
MALVERN, PENNSYLVANIA 19355

SERIAL NUMBER: 09920267
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 08/01/2001
ISSUE DATE:

012149/0235 PAGE 2

ANTHONY ROYALL, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

09-14-2001

RECORDA
PA



101842409

Commissioner of Patent and Trademarks:

Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies): Jill Giles-Komar George Heavner Linda Snyder Mohit Trikha 8.31.01 Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No		2. Name and address of receiving party(ies): Name: Centocor, Inc. Street Address: 200 Great Valley Parkway City: Malvern. State: PA Zip: 19355 Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No	
3. Nature of conveyance: ☒ Assignment ☐ Merger ☐ Security Agreement ☐ Change of Name ☐ Other _____ Execution Date: July 31 and August 1, 2001			
4. Application number(s) or patent number(s): 09/920,267 If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: A. Patent Application No.(s) B. Patent No.(s) Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No			
5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed: Philip B. Johnson, Esq. Chief Patent Counsel Johnson & Johnson One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, NJ 08903-7003		6. Total number of applications & patents involved: <u>1</u> 7. Total fee (37 CFR 3.41): <u>\$40.00</u> ☒ Authorized to be charged to Deposit Account 8. Deposit Account Number: 10-0750/CEN0249/CHKT	
9. Statement and signature To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. William K. Wising Name of Person Signing Signature August 29, 2001 Date Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 7			

Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:

Box Assignments
Commissioner of Patent and Trademarks
Washington, D.C. 20231

09/12/2001 LABELLER 00000310 100730 0720007

01 FC:581

40.00 CN

FO

DOCKET NO. CEN0249
Joint Inventors

A S S I G N M E N T

Serial No. 09/920,267
Filed 8/1/01

WHEREAS, Jill Giles-Komar, George Heavner, Linda Snyder, and Mohit Trikha, residing at 31 Blakely Road, Downingtown, PA 19335, 6 Oak Glen Drive, Malvern, PA 19355, 1795 Honeysuckle Lane, Pottstown, PA 19465, and 278 Orchard Road, Paoli, PA 19301, respectively (hereinafter called "Assignors"), have made certain new and useful inventions or discoveries relating to

Anti-Dual Integrin Antibodies, Compositions, Methods And Uses

for which they have executed an application for Letters Patent of the United States; and

WHEREAS, Centocor, Inc., a corporation of the State of Pennsylvania, (hereinafter called "Assignee"), is desirous of acquiring Assignors' entire right, title, and interest therein:

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN that for and in consideration of the sum of One Dollar and other valuable considerations to them moving, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, and transferred, and do hereby sell, assign and transfer unto said Assignee their entire right, title and interest in and to all said inventions and discoveries disclosed in said application whose identification above by serial number and filing date, when available is hereby authorized, and in and to said application, all substitutions, divisions, and continuations thereof, and in and to all Letters Patent, United States and foreign, that may be granted for said inventions and discoveries, and in and to all extensions, renewals, and reissues thereof, the same to be held and enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors if this Assignment and sale had not been made;

And Assignors hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States to issue said Letters Patent in accordance with this Assignment;

And for the consideration aforesaid, Assignors covenant and agree with said Assignee that he has a full and unencumbered title to the inventions and discoveries above

described and hereby assigned, which title they warrant unto said Assignee, its successors and assigns;

And for the consideration aforesaid, Assignors further covenant and agree that they will, whenever requested, but without cost to them promptly communicate to said Assignee or its representatives any facts known to them relating to said inventions and discoveries, testify in any interference or legal proceedings involving said inventions and discoveries, and execute any additional papers that may be necessary to enable said Assignee or its representatives, successors, nominees, or assigns to secure full and complete protection for the said inventions and discoveries or that may be necessary to vest in said Assignee the complete title to the said inventions and discoveries and patents hereby conveyed and to enable it to record said title.

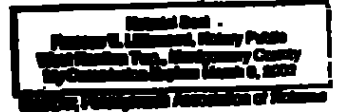
12

Jill Giles-Komar
Jill Giles-Komar

STATE OF Pennsylvania)

BE IT REMEMBERED, That on this 31 day of July, 2001, before me, a Notary Public, personally appeared Jill Giles-Komar, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed, sealed, and delivered the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Francis V. Lincow
Notary Public



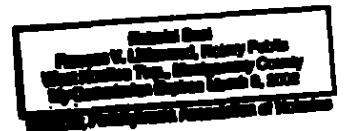
IN TESTIMONY WHEREOF, Assignee has hereunto set his
hand and seal this 21 day of July, 2001

George Heuniger (L.S.)

STATE OF Pennsylvania) ss.
COUNTY OF Chester)

BE IT REMEMBERED, That on this 31st day of July, 2001, before me, a Notary Public, personally appeared George Heavner, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Francis V. Luten
Notary Public



14

July, 1941

) 88.

August

Notary Public



15

N. H. S.
N. H. S.

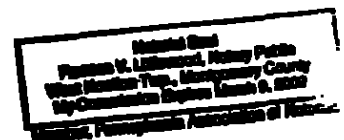
STATE OF Pennsylvania)

1) 93.

COUNTY OF Chester

BE IT REMEMBERED, That on this 31st day of July, 2001, before me, a Notary Public, personally appeared Mohit Trikha, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

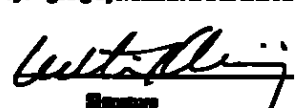
Francis L. Linnwood
Notary Public



RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

Commissioner of Patent and Trademarks:

Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies): Jill Giles-Komar George Heavner Linda Snyder Mohit Trikha Additional name(s) of conveying party(ies) attached? _ Yes ☒ No		2. Name and address of receiving party(ies): Name: Centocor, Inc. Street Address: 200 Great Valley Parkway City: Malvern State: PA Zip: 19355 Additional name(s) & address(es) attached? _ Yes ☒ No	
3. Nature of conveyance: ☒ Assignment ☐ Merger ☐ Security Agreement ☐ Change of Name ☐ Other _____ Execution Date: July 31 and August 1, 2001			
4. Application number(s) or patent number(s): 09/920,267 If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: A. Patent Application No.(s) B. Patent No.(s) Additional numbers attached? _ Yes ☒ No			
5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed: Philip E. Johnson, Esq. Chief Patent Counsel Johnson & Johnson One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, NJ 08933-7000		6. Total number of applications & patents involved: <u>1</u> 7. Total fee (37 CFR 1.41) _____ \$40.00 ☒ Authorized to be charged to Deposit Account 8. Deposit Account Number: 10-0750/CEN0249/GKT	
9. Statement and signature To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. William K. Whaley  August 29, 2001 Name of Person Signing Signature Date Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 7			

Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:

Box Assignments
Commissioner of Patent and Trademarks
Washington, D.C. 20231

17

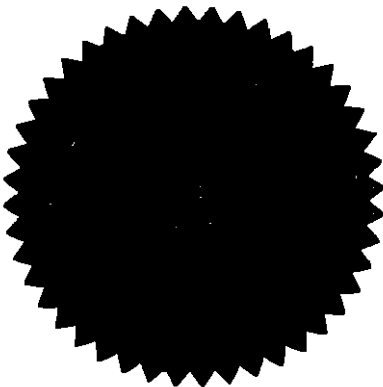
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
CHRISTINA A CLICKNER
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
CHRISTINA A CLICKNER, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 13TH DAY OF FEBRUARY 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A166340
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

CEN 186/249 COL(L)

CERTIFICATION

I hereby certify that I have compared the attached document with the original, and that such said document is a true copy of the original Assignment document as filed in the U.S. Patent Office in connection with USSN 60/223,363 filed AUGUST 7, 2000.

A handwritten signature in cursive script, reading "Christina A. Clickner", written over a horizontal line.

**Christina A. Clickner
(Notary Public of New Jersey)
My Commission Expires:
March 2, 2005**

A

DOCKET NO. CEN0186
Joint Inventors

A S S I G N M E N T

Serial No. 60/223,363
Filed August 7, 2000

WHEREAS, Jill Giles-Komar, George Heavner, Linda Snyder, and Mohit Trikha, residing at 31 Blakely Road, Downingtown, PA 19335, 6 Oak Glen Drive, Malvern, PA 19355, 1795 Honeysuckle Lane, Pottstown, PA 19465, and 278 Orchard Road, Paoli, PA 19301, respectively (hereinafter called "Assignors"), have made certain new and useful inventions or discoveries relating to

Dual Integrin Antibodies, Compositions, Methods And Uses

for which they have executed an application for Letters Patent of the United States; and

WHEREAS, Centocor, Inc., a corporation of the State of Pennsylvania, (hereinafter called "Assignee"), is desirous of acquiring Assignors' entire right, title, and interest therein:

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN that for and in consideration of the sum of One Dollar and other valuable considerations to them moving, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, and transferred, and do hereby sell, assign and transfer unto said Assignee their entire right, title and interest in and to all said inventions and discoveries disclosed in said application whose identification above by serial number and filing date, when available is hereby authorized, and in and to said application, all substitutions, divisions, and continuations thereof, and in and to all Letters Patent, United States and foreign, that may be granted for said inventions and discoveries, and in and to all extensions, renewals, and reissues thereof, the same to be held and enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors if this Assignment and sale had not been made;

And Assignors hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States to issue said Letters Patent in accordance with this Assignment;

And for the consideration aforesaid, Assignors covenant and agree with said Assignee that he has a full and unencumbered title to the inventions and discoveries above

described and hereby assigned, which title they warrant unto said Assignee, its successors and assigns;

And for the consideration aforesaid, Assignors further covenant and agree that they will, whenever requested, but without cost to them promptly communicate to said Assignee or its representatives any facts known to them relating to said inventions and discoveries, testify in any interference or legal proceedings involving said inventions and discoveries, and execute any additional papers that may be necessary to enable said Assignee or its representatives, successors, nominees, or assigns to secure full and complete protection for the said inventions and discoveries or that may be necessary to vest in said Assignee the complete title to the said inventions and discoveries and patents hereby conveyed and to enable it to record said title.

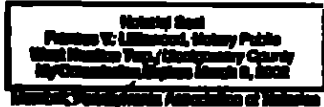
IN TESTIMONY WHEREOF, Assignee has hereunto set her hand and seal this 14 day of June, 2001

Jill Giles-Komar (L.S.)
Jill Giles-Komar

STATE OF PA)
COUNTY OF Chester) ss.

BE IT REMEMBERED, That on this 14 day of June, 2001, before me, a Notary Public, personally appeared Jill Giles-Komar, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed, sealed, and delivered the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Francis V. Linderwood
Notary Public



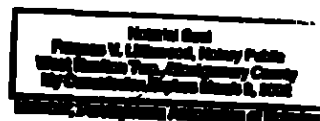
IN TESTIMONY WHEREOF, Assignee has hereunto set her hand and seal this 11th day of June, 2001

Linda Snyder (L.S.)

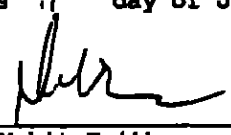
STATE OF Pa.) ss.
COUNTY OF Chester)

BE IT REMEMBERED, That on this 11th day of June, 2001, before me, a Notary Public, personally appeared Linda Snyder, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed, sealed, and delivered the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Francis V. Lawrence
Notary Public



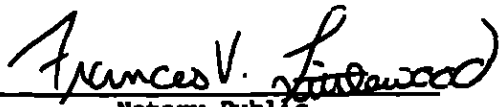
IN TESTIMONY WHEREOF, Assignee has hereunto set his hand and seal this 11 day of June, 2001



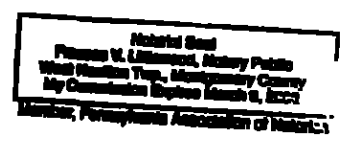
Mohit Trikha (L.S.)

STATE OF PA)
COUNTY OF Chester) ss.

BE IT REMEMBERED, That on this 11 day of June, 2001, before me, a Notary Public, personally appeared Mohit Trikha, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.



Notary Public



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12501 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/13,
C07K 16/28, C12N 15/79, 5/10, A61K 39/395, C07K
16/42, G01N 33/50, 33/577, A61P 37/00

(21) International Application Number: PCT/US01/24784

(22) International Filing Date: 7 August 2001 (07.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/223,363 7 August 2000 (07.08.2000) US
09/920,267 1 August 2001 (01.08.2001) US

(71) Applicant: CENTOCOR, INC. [US/US]; 300 Great Val-
ley Parkway, Malvern, , PA 19355 (US).

(72) Inventors: GILES-KOMAR, Jill; 31 Blakely Road,
Downingtown, PA 19355 (US). HEAVNER, George; 6
Oak Glen Drive, Malvern, PA 19355 (US). SNYDER,
Linda; 1795 Honeysuckle Lane, Pottstown, PA 19465
(US). TRIKHA, Mohit; 278 Orchard Road, Paoli, PA
19301 (US).

(74) Agents: JOHNSON, Philip, S. et al.; One Johnson &
Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, ZA, ZW.

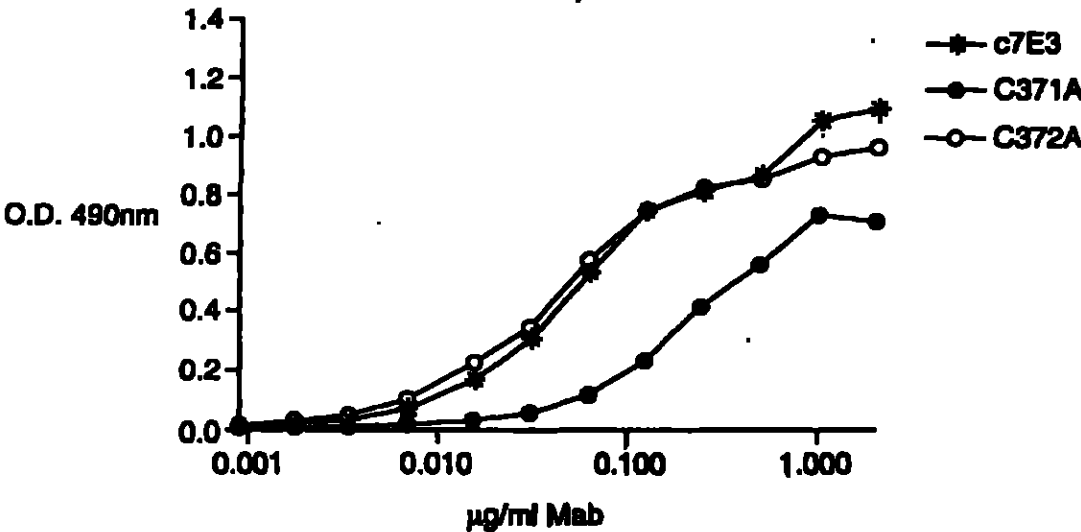
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTI-DUAL INTEGRIN ANTIBODIES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES

Binding of GenPharm Mabs to
 $\alpha V\beta 3$



(57) Abstract: The present invention relates to at least one novel anti-dual integrin antibodies, including isolated nucleic acids that encode at least one anti-dual integrin antibody, dual integrin, vectors, host cells, transgenic animals or plants, and methods of making

VO 02/12501 A2

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CEN0249	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 01/ 24784	International filing date (day/month/year) 07/08/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07/08/2000
Applicant CENTOCOR, INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amine acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☒ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

1
☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

27

International Application No
PCT/US 01/24784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/13 C07K16/28 C12N15/79 C12N5/10 A61K39/395
C07K16/42 G01N33/50 G01N33/577 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, ENBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 31248 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2 June 2000 (2000-06-02) the whole document	1-101
A	--- S. TAM ET AL.: "Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha (v)beta3 integrins." CIRCULATION , vol. 98, no. 11, 15 September 1998 (1998-09-15), pages 1085-1091, XP000882678 abstract --- -/-	1-101

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2002

Date of mailing of the international search report

23/09/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5616 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 esp nl.

Authorized officer

Signature

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/24784

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.,
A	M. TRIKHA ET AL.: "A potential new application for a cardiovascular drug: Role for ReoPro (Abciximab), an inhibitor of gpIIb/IIIa and alphaVbeta3 integrins, as an anti-cancer agent." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 41, March 2000 (2000-03), page 577 XP002212901 USA abstract #3678	1-101
A	S. SUZUKI ET AL.: "cDNA and amino acid sequences of the cell adhesion protein receptor recognizing vitronectin reveal a transmembrane domain and homologies with other adhesion protein receptors." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 83, no. 22, November 1986 (1986-11), pages 8614-8618, XP002212902 Washington, DC, USA abstract figure 2	1-101
A	M. LEHMANN ET AL.: "A monoclonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins alphaVbeta3, alphaVbeta5, and alphaVbeta6." CANCER RESEARCH, vol. 54, 15 April 1994 (1994-04-15), pages 2102-2107, XP002103619 Baltimore, MD, USA abstract	1-101
A	WO 00 44404 A (CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES) 3 August 2000 (2000-08-03) claims	1-101

added
7/9/02 185

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/24784

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 12-15, 32-35, 52-55, 72-75, 92-95 are directed to a method of treatment of the human/animal body or a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/24784

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031248	A	02-06-2000	US 6160099 A EP 1135477 A1 WO 0031248 A1	12-12-2000 26-09-2001 02-06-2000
WO 0044404	A	03-08-2000	AU 2737900 A BR 0007875 A CN 1355711 T CZ 20012793 A3 EP 1150714 A2 NO 20013750 A WO 0044404 A2	18-08-2000 13-02-2002 26-06-2002 13-03-2002 07-11-2001 28-09-2001 03-08-2000

PCT REQUEST

CEN0249

Original (for SUBMISSION) - printed on 06.08.2001 03:13:21 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.03.2001)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	CEN0249
I	Title of invention	ANTI-DUAL INTEGRIN ANTIBODIES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name	CENTOCOR, INC.
II-5	Address:	200 Great Valley Parkway Malvern,, PA 19355 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	610.651.6000
II-9	Facsimile No.	732.524.2808
II-10	e-mail	ktownse2@corus.jnj.com
II-11	Applicant's registration No. with the Office	34,033
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	inventor only
III-1-4	Name (LAST, First)	GILES-KOMAR, Jill
III-1-5	Address:	31 Blakely Road Downingtown, PA 19355 United States of America
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	inventor only
III-2-4	Name (LAST, First)	HEAVNER, George
III-2-5	Address:	6 Oak Glen Drive Malvern, PA 19355 United States of America

PCT REQUEST

CEN0240

Original (for SUBMISSION) - printed on 08.08.2001 03:13:21 PM

II-3	Applicant and/or inventor	
II-3-1	This person is:	inventor only
II-3-4	Name (LAST, First)	SNYDER, Linda
II-3-5	Address:	1795 Honeysuckle Lane Pottstown, PA 19465 United States of America
II-4	Applicant and/or inventor	
II-4-1	This person is:	inventor only
II-4-4	Name (LAST, First)	TRIKHA, Mohit
II-4-5	Address:	278 Orchard Road Paoli, PA 19301 United States of America
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	JOHNSON, Philip, S.
IV-1-2	Address:	One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, NJ 08933 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	732.524.2368
IV-1-4	Facsimile No.	732.524.2808
IV-1-5	e-mail	ktownse2@corus.jnj.com
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	TOWNSEND, Guy, K. (34,033)
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GE GM KE LS MW ME SD SL SE TE UG ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AE BY KG KE MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE CH LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

PCT REQUEST

CEN0240

Original (for SUBMISSION) - printed on 08.08.2001 03:13:21 PM

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BE CA CH&LI CN CO CR CU CE DE DK DM DE EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KE LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX ME NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZW	
V-8	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-8 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-8	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	07 August 2000 (07.08.2000)	
VI-1-2	Number	60/223,363	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority claim of earlier national application		
VI-2-1	Filing date	01 August 2001 (01.08.2001)	
VI-2-2	Number		
VI-2-3	Country	US	
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

PCT REQUEST

CEN0240

Original (for SUBMISSION) - printed on 05.05.2001 03:13:21 PM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	87	-
IX-3	Claims	13	-
IX-4	Abstract	1	EEABST00.TXT
IX-5	Drawings	24	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	129	
IX-6a	Sequence listing part of description filed in computer readable form only (under Section 801(a)(II))	-	1 Diskette
IX-7	TOTAL	129	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-10	Sequence listing in computer readable form:		
IX-10 (b)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name	CENTOCOR, INC.	
X-1-2	Name of signatory	Guy Kevin Townsend	
X-1-3	Capacity	Assistant Secretary	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

CEN0249

Original (for SUBMISSION) - printed on 08.08.2001 03:13:21 PM

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

8	For receiving Office use only			
0-1	International Application No.			
0-2	Date stamp of the receiving Office			
0-4	Form - PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.03.2001)		
0-6	Applicant's or agent's file reference	CEN0249		
2	Applicant	CENTOCOR, INC.		
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	total amounts (USD)	
12-1	Transmittal fee T	⇒	240	
12-2	Search fee S	⇒	846	
12-3	International fee			
	Sub-total number of sheets	129		
	Basic fee (first 30 sheets) b1	382		
12-4	Remaining sheets	99		
12-5	Additional amount (X) b2	9		
12-6	Total additional amount b3	891		
12-6a	Additional component	400		
12-6b	Additional amount (X) b3	9		
12-6c	Total additional component b3	3,600		
12-7	b1 + b2 + b3 =	4,873		
12-8	Designation fees			
	Number of designations contained in international application	88		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 6)	6		
12-10	Amount of designation fee (X) b2	82		
12-11	Total designation fees D	492		
12-12	PCT-EASY fee reduction R	-117		
12-13	Total international fee (B+D-R) I	⇒	5,248	
12-14	Fee for priority document			
	Number of priority documents requested	1		
12-15	Fee per document (X) b2	15		
12-16	Total priority document fee P	⇒	15	
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒	6,349	
12-18	Mode of payment	authorization to charge deposit account		
12-20	Deposit account instructions The receiving Office:	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)		
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above.	<i>✓ Aug/16</i>		

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

CEN0248

Original (for SUBMISSION) - printed on 06.08.2001 03:13:21 PM

12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓ <i>By K 21</i>
12-20-3	Authorization to charge the fee for priority document.	✓ <i>By K 21</i>
12-21	Deposit account No.	10-0750-CEN0249/GKT
12-22	Date	06 August 2001 (06.08.2001)
12-23	Name and signature	Guy Kevin Townsend <i>By K 21</i>

VALIDATION LOG AND REMARKS

13-3-3	Validation messages Status	Green? More designations could be made. The following States have not been designated: US. Please verify.
13-3-4	Validation messages Priority	Yellow Priority 2: Application No. is missing
13-3-7	Validation messages Contents	Green? Priority 2. The priority document is not enclosed. (The applicant must furnish it within 16 months from the earliest priority date claimed)
13-3-8	Validation messages Fees	Green? Please confirm that fee schedule utilized is the latest available
13-3-9	Validation messages Payment	Green? Please ensure that you have a valid deposit account with the receiving Office selected.

**ANTICUERPOS INTEGRIN ANTI-DUALES, COMPOSICIONES, MÉTODOS
Y USOS**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está basada en parte sobre, y reclama prioridad de la solicitud de Patente Provisional 60/223.363, presentada el 7 de agosto de 2000, la cual está incorporada aquí por vía de referencia.

- 10 La presente invención se relaciona con anticuerpos, que incluyen porciones o variantes especificadas, específicos para al menos una proteína integrin dual alfa-v-beta3, alfa-v-beta5 (integrin dual) o sus fragmentos, así como también ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos integrin anti-
- 15 métodos de hacer y utilizar los mismos, incluyendo formulaciones terapéuticas, administración y dispositivos.

TÉCNICA RELACIONADA

- 20 Existe ahora evidencia considerable de que el desarrollo progresivo de tumores depende de la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, para proveer los tumores de nutrientes y oxígeno, para retirar productos de desecho y para actuar como conductos para la metástasis de células tumorales hasta sitios distantes (Gastl y colaboradores,

proteínas heterodiméricas de transmembrana que desempeñan papeles críticos en adhesión de células a la matriz extracelular (ECM) la cual, a su vez, ajusta la supervivencia de las células, la proliferación y migración a través de señalización intracelular. Durante la angiogénesis, un número de

5 integrines que son expresados sobre la superficie de células endoteliales activadas regulan interacciones adhesivas críticas con una variedad de proteínas ECM para regular eventos biológicos distintos tales como migración, proliferación y diferenciación de células. Específicamente, los integrines estrechamente relacionados pero distintos $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ han sido

10 mostrados para intervenir caminos independientes en el proceso angiogénico. Un anticuerpo generado contra $\alpha V\beta 3$ bloqueó la génesis inducida por el factor de desarrollo de fibroblasto básico (bFGF), en tanto que un anticuerpo específico para $\alpha V\beta 5$ inhibió la angiogénesis inducida por el factor de desarrollo endotelial vascular (VEGF) (Eliceiri, y colaboradores;

15 J.Clin. Invest. 103: 1227-1230 (1990); Fierdlander y colaboradores, Science 270: 1500-1502 (1995)).

Anticuerpos mamíferos no humanos, quiméricos, policlonales (por ejemplo, anti-suero) y/o monoclonales (Mabs) y fragmentos (productos de

20 digestión proteolítica o productos de infusión de proteínas) son agentes terapéuticos potenciales que están siendo investigados en algunos casos para intentar tratar ciertas enfermedades. No obstante, tales anticuerpos o fragmentos pueden producir una respuesta inmune al administrarse a seres

circulación, y hacer la administración repetida inadecuada para terapia, reduciendo por este medio el beneficio terapéutico para el paciente y limitando la readministración del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, administración repetida de anticuepros o fragmentos que comprenden

5 porciones no humanas puede conducir a enfermedad de suero y/o anafalaxis. Con el fin de evitar estos y otros problemas, se han adoptado un número de enfoques para reducir la inmunogenicidad de tales anticuerpos y sus porciones, incluso quimerización y humanización, como es bien sabido en la técnica. Estos y otros enfoques, no obstante, todavía pueden originar

10 anticuerpos o fragmentos que tienen alguna inmunogenicidad, baja afinidad, baja avidéz, o con problemas en cultivo de células, agrandar en proporción producción y/o bajos rendimientos. De esta manera, tales anticuerpos o fragmentos pueden ser menos que idealmente adecuados para manufactura o uso como proteínas terapéuticas.

15

En consecuencia, existe necesidad de proveer anticuerpos integrones anti-duales o fragmentos que superan uno o más de estos problemas, así como también mejoras sobre anticuerpos conocidos o sus fragmentos.

20 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee anticuerpos integrones anti-duales aislados de humanos, de primates, roedores, de mamíferos, quiméricos, humanizados y/o CDR-injertados, inmunoglobulinas, productos de

39
40

codifican o ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales transgénicos, plantas transgénicas y métodos de hacerlos y utilizarlos, según aquí se describe y se capacita, en combinación con lo que es conocido en la técnica. La presente

5 invención suministra también al menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado como aquí se describe. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluye cualquier proteína o péptido que contenga molécula que comprende por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero no está limitada a por lo menos una región determinante

10 complementaria (CDR) de una cadena pesada o liviana o un ligando que una sus porciones, una región variable de cadena pesada o de cadena liviana, una región constante de cadena pesada o de cadena liviana, una región de estructura, o cualquier porción de la misma, que pueda ser incorporada a un anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo de la invención puede

15 incluir o ser derivado de cualquier mamífero, tal como pero no está limitado a un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, o cualquier combinación de los mismos, y similares.

La presente invención provee, en un aspecto, moléculas de ácido

20 nucleico aisladas que comprenden, complementarios o hibridizantes a, un polinucleótido que codifica anticuerpos específicos integrines anti-duales, que comprende por lo menos una secuencia, dominio, porción o variante del mismo especificado. La presente invención provee adicionalmente vectores

nucleicos y/o vectores recombinantes, así como también métodos de hacer y/o utilizar tales ácidos nucleicos de anticuerpo, vectores y/o células huésped.

- 5 Al menos un anticuerpo de la invención liga por lo menos un epítope especificado específico a por lo menos una proteína integrin dual, subunidad, fragmento, porción o cualquier combinación de los mismos. El por lo menos un epítope puede comprender por lo menos un anticuepro que une la región que comprende por lo menos una porción de dicha proteína, el
- 10 cual epítope está de preferencia formado por por lo menos 1-5 aminoácidos de una proteína integrin dual tal como, pero no está limitado a, (a) 29-48, 58-63, 69-79, 82-85, 88-134, 140-157, 161-183, 186-190, 192-198, 202-212, 215-217, 223-237, 240-244, 248-255, 259-268, 287-301, 313-322, 326-328, 332-344, 348-351, 354-365, 376-387, 393-401, 407-414, 417-419, 422-433,
- 15 443-451, 458-461, 465-469, (b) 32-41, 46-47, 53-55, 58-69, 72-74, 77-79, 85-88, 91-94, 96-105, 110-113, 117-125, 129-142, 145-153, 155-159, 161-163, 166-170, 172-174, 184-197, 200-209, 215-218, 221-225, 184-197, 200-209, 215-218, 221-225, 227-250, 259-261, 263-267, 269-270, 275-281; y (c)
- 20 29-35, 43-45, 48-63, 67-69, 72-74, 80-82, 84-87, 95-105, 108-113, 117-142, 145-163, 166-170, 172-176, 184-186, 191-201, 204-206, 216-219, 224-226, 229-251, 260-262, 264-268, 276-282, 286-288, 294-299, 301-318, 323-325, 328-330, 338-342, 345-349, 353-358, de SEQ ID No: 9, 16 y 17, respectivamente de los mismos, o tal como pero no está limitado a, al menos

citoplástico, de dicha proteína integrin dual, subunidad o cualquier porción de la misma.

El por lo menos un anticuerpo opcionalmente puede comprende por lo
 5 menos una porción especificada de al menos una región determinante
 complementaria (CDR) (por ejemplo, CDR1, CDR2, o CDR3 de la región
 pesada o liviana de la cadena variable) y/o una región de estructura
 constante o variable en cualquier porción del mismo. La al menos una
 secuencia de aminoácido de anticuerpo puede adicionalmente comprender
 10 de manera opcional por lo menos una sustitución, inserción o supresión
 especificada tal como aquí se describe o como es sabido en la técnica.

La presente invención proporciona también al menos un anticuerpo
 integrin aislado anti-dual según aquí se describe, en donde el anticuerpo
 15 tiene por lo menos una actividad, tal como, pero no limitada a inhibición de
 conexión de vitronectina, inhibición de conexión de alfa-v-beta-3 a por lo
 menos uno de un ligando alfa-v-beta3 o receptor, inhibición de conexión de
 alfa-v-beta-5 a al menos uno de un ligando o receptor alfa-v-beta-5,
 modulación de angiogénesis, conexión a integrin binario o células que
 20 expresan integrin individual. Un anticuerpo de integrin anti-dual puede de
 esta manera ser examinado para una actividad correspondiente de acuerdo
 con métodos conocidos, tal como pero no está limitado a, al menos una
 actividad biológica hacia una proteína integrin dual.

La presente invención provee adicionalmente al menos un anticuerpo de anti-idiotipo de integrin dual a al menos un anticuerpo de integrin dual de la presente invención. El anticuerpo de anti-idiotipo incluye cualquier proteína o péptido que contenga molécula que comprenda por lo menos una
5 porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero no limitada a por lo menos una complementariedad que determina la región (CDR) de una cadena pesada o liviana o una porción de la misma de conexión de ligando, una región variable de cadena pesada o de cadena liviana, una región constante de cadena pesada o de cadena liviana, una región de estructura, o
10 cualquier porción de la misma, que pueda ser incorporada dentro de un anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo de la invención puede incluir o puede ser derivado de cualquier mamífero, tal como pero no está limitado a un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, y similares.

15

La presente invención provee, en un aspecto, moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden, complementarias, o hibridizantes a, un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo de anti-idiotipo integrin dual, que comprend epor lo menos una secuencia especificada, dominio,
20 porción o variante del mismo. La presente invención provee adicionalmente vectores recombinantes que comprende dicho anticuerpo de anti-idiotipo integrin dual que codifica moléculas de ácido nucleico, células huésped que contienen tales vectores de ácidos nucleico y/o recombinantes, así como

La presente invención provee también al menos un método para expresar al menos un anticuerpo integrin anti-dual, o anticuerpo anti-idiotipo integrin dual, en una célula huésped, que comprende cultivar una célula huésped según aquí se describe bajo condiciones en donde al menos un
5 anticuerpo integrin anti-dual es expresado en cantidades detectables y/o recuperables.

La presente invención provee también por lo menos una composición que comprende (a) un anticuerpo integrin anti-dual aislado que codifica ácido
10 nucleico y/o anticuerpo según aquí se describió; y (b) un portador o diluyente adecuado. El portador o diluyente puede opcionalmente ser farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con portadores o diluyentes conocidos. La composición puede opcionalmente comprender además al menos un compuesto, proteína o composición adicional.

15

La presente invención provee adicionalmente por lo menos un método o composición de anticuerpo integrin anti-dual, para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva para modular o tratar al menos una condición dual relacionada con integrin en una célula, tejido órgano, animal o paciente y/o
20 antes de, subsiguiente a, o durante una condición relacionada, tal como se sabe en el arte y/o como aquí se describe.

La presente invención también provee al menos una composición,

profilácticamente efectiva de al menos un anticuerpo integrin anti-dual, de acuerdo con la presente invención.

La presente invención proporciona adicionalmente al menos un
5 método o composición de anticuerpo integrin anti-dual, para diagnosticar al
menos una condición relacionada con integrin dual en una célula, tejido, u
órgano, animal o paciente y/o antes de, subsiguiente a, o durante una
condición relacionada, tal como se sabe en la técnica y/o según aquí se
describe.

10

La presente invención también provee al menos una composición,
dispositivo y/o método de suministrar para diagnóstico de por lo menos un
anticuerpo integrin anti-dual, de acuerdo con la presente invención.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una gráfica de diluciones que se duplican de
Mabs anti- $\alpha V\beta 3$ que fueron incubadas en placas recubiertas con $\alpha V\beta 3$
durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas dos
veces y probadas con HRP rotulado anticuerpo específico IgG kappa de
20 cabra durante 1 hora a RT. Las placas fueron lavadas nuevamente,
desarrolladas con sustrato de OPD y medidas de OD a 490 nm.

La Figura 2 muestra una gráfica de células de calceína rotulada M21 que

recubiertas con vitronectina durante 45 minutos. Células de M21 no ligadas fueron retiradas con dos lavados de pozo de 150 μ L/pozo con HBSS con calcio. La placa fue leída sobre un fluorómetro a 485-538 nm.

5 La Figura 3 muestra una gráfica de adhesión de células en donde células MDAMB435L2 fueron cosechadas y pre-incubadas con varias concentraciones de GenO95 durante 10 minutos. Células tumorales fueron añadidas entonces a placas Linbro recubiertas con vitronectina e incubadas a 37°C durante 1 hora. Los pozos fueron lavados tres veces y la tintura AQ
10 del título de la célula a base de MTT fue agregada a cada pozo. La adhesión de las células fue determinada en un lector de placa ELISA en donde OD490 nm es directamente proporcional a la adhesión de las células. La adhesión de las células a pozos recubiertos con BSA sirvió como control negativo (no se muestran datos). Cada punto de datos es el promedio de determinaciones
15 en triplicado.

Las figuras 4A-D muestran gráficas que se une a VVE3 en donde este ligando fue preincubado en diluciones que se duplican principiando a 10: g/mL con 50 mM EDTA en 1% de BSA-HBSS (en la ausencia de Ca⁺⁺) o
20 con 1% de BSA-HBSS (con Ca⁺⁺) durante 30 minutos, 37EC. Mezclas agregadas a placas recubiertas con CNTO 95, C372, c7E3 o LM609 IgG e incubadas durante 1 hora, a 37°C. LM609 o CNTO 95 agregado a 20: g/mL en buffer apropiado (+/- Ca⁺⁺) durante 30 minutos, a 37°C. Las placas

Las figuras 4E-G muestran gráficas que se une a $\alpha V\beta 5$ en donde este ligando fue preincubado en diluciones que se duplican principiando a 10: g/mL con 50 mM EDTA en 1% de BSA-HBSS (en la ausencia de Ca^{++}) o con 1% de BSA-HBSS (con Ca^{++}) durante 30 minutos, 37°C. Mezclas
5 agregadas a placas recubiertas con CNTO 95, C372, c7E3 IgG e incubadas durante 1 hora, a 37°C. VNR139 fue agregado a 10: g/mL es buffer apropiado (+/- Ca^{++}) durante 30 minutos, a 37°C. Las placas fueron probadas con macho cabrío anti-ratón IgG Fc, HRP, de cabra.

10 Las figura 5A- B muestra una gráfica de curva de conexión de saturación de GenO.95 (Fig 5A) y ReoPro (Fig. 5B) sobre placas recubiertas con $\alpha V\beta 3$.

La Figura 6 A-B muestra una gráfica de curva de saturación de enlace
15 de Gen.O95 (Fig. 5A) y ReoPro (Fig. 5B) sobre placas recubiertas con $\alpha V\beta 5$.

La Figura 7A-C muestra curvas de unión de saturación con gráficas de conexión a (Fig. 7A): A375S2; (Fig. 7B): HT-29; (Fig. 7C): M21. Células
20 fueron recubiertas con una capa adherente dos días antes del experimento, y con 1×10^5 células/pozo en el momento del estudio. El ^{125}I GenO.95 ($1 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) fue añadido en un medio de cultivo al 1% y se incubó sobre células durante 1,5 h, a 37°C. Se determinó agente de conexión no específico

veces y contadas para determinar radioactividad ligada. Cada curva representa 4-5 estudios separados, y cada punto de datos en un experimento fue la media de muestras triplicadas.

5 La Figura 8A-C muestra curvas de saturación de conexión a (Fig. 8A): A375S2; (Fig. 8B): HT-29; (Fig. 8C):M21. Se plantaron células dos días antes de la experimentación, y 1×10^5 células/pozo en el momento del estudio. Se agregó ^{125}I ReoPro ($1 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) en medio de cultivo al 1% y se incubó sobre células durante 1,5 h, a 37°C . Se determinó agente de
10 conexión no específico utilizando 100 x mAb frío en los medios. Las células fueron lavadas tres veces y contadas para determinar radioactividad ligada. Cada curva representa 4-5 estudios separados, y cada punto de datos en un experimento fue la media de muestras por triplicado.

15 La Figura 9 muestra una representación de formación microcapilar de células endoteliales de perlas MC cultivadas en geles de fibrina. Lente objetivo: 40X. El ensayo fue llevado a cabo según se describe en Métodos del Ejemplo 4.

20 La Figura 10 muestra una gráfica de cuantificación de formación capilar en un gel de fibrina en medios que contienen 30 ng/ml de bFGF disuelto al 0,1% en suero. El número de brotes microcapilares fueron cuantificados según se describe en Métodos del Ejemplo 4. El control indica

negativos. LM-P1F6 es una combinación tanto de LM609 como de P1F6. Cada barra representa la media de 6 pozos (+/- SD).

La Figura 11 muestra una gráfica de cuantificación de formación capilar en un gel de fibrina en medios completos. El número de brotes microcapilares fue cuantificado según se describe en Métodos del Ejemplo 4. Control indica control de vehículo. Ratón (m) y humano (h)- IgG sirvieron como controles negativos. LM-P1F6 es una combinación tanto de LM609 como de P1F6. Cada barra representa la media de seis pozos (+/- SD).

10

La Figura 12. Las células HT29 (Figura 12A, B y C) expresan $\alpha V\beta 5$, pero ningún $\alpha V\beta 3$ integrin sobre su superficie. HUVEC (Figura 12D, E y F) y A375S.2 (Figura 12G, H e I) expresan células $\alpha V\beta 5$ y $\alpha V\beta 3$ sobre su superficie. Células tumorales y células endoteliales estaban manchadas por inmunofluorescencia y analizadas por citometría de flujo. El histograma del lado izquierdo representa fluoeresencia de fondo en presencia de anticuerpo enfrentado a isotipo. El histograma en el lado derecho indica tintura positiva. A, D, G, LM609 (mAb dirigido a $\alpha V\beta 3$, 10 $\mu\text{g/ml}$); B, E, H, PIF6 (mAb dirigido a $\alpha V\beta 5$, 10 $\mu\text{g/ml}$); y C, F, I, GenO95 (10 $\mu\text{g/ml}$).

20

Figura 13. Adhesión de HUVECS a placas de matriz recubiertas con proteína. Se llevó a cabo ensayo de adhesión según se describe en los métodos del Ejemplo 5. La placa fue leída sobre fluorómetro a 485-538 nm.

La Figura 13, el grado de adhesión de células en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo fue representada gráficamente como un porcentaje de adhesión de células en ausencia de anticuerpo que fue considerado como 100%. Cada punto de datos es el medio de 5 determinaciones por triplicado ($\pm$ SD).

Figura 14. Adhesión de células de melanoma humano a placas recubiertas con matriz de proteína. El ensayo de adhesión fue llevado a cabo según se describe en Métodos. La adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. En la Figura 14 la adhesión externa de células en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo fue representada gráficamente como un porcentaje de adhesión de células en ausencia de anticuerpo que fue considerado como 100%. Cada punto de datos es la media de determinaciones por triplicado ($\pm$ SD).

15

Figura 15. Adhesión de células HT29 de carcinoma de colon humano a vitronectina. El ensayo de adhesión fue llevado a cabo tal como se describe en Métodos. La Adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como un control negativo. Los datos en la Figura 15 son representados gráficamente como porcentaje de máxima adhesión (ausencia de anticuerpo), y constituyen la media de determinaciones por triplicado ($\pm$ SD).

20

fueron dejadas migrar durante 6 h. Fotomicrografías son campos representativos (lente objetivo 10x) de migración de células en la Figura 16A, en ausencia de anticuerpo, (16B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), (16C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$). La Figura 16D es una representación gráfica de migración de células en presencia de concentraciones variables de GenO95. Los datos fueron normalizados hasta porcentaje de control (sin anticuerpos) el cual fue considerado como 100%, y cada punto es el medio de tres filtros de transpozo (+/- SD).

Figura 17. Migración de HUVECS hacia 2 $\mu\text{g/ml}$ vitronectina en la presencia de anticuerpos para $\alpha\text{V}\beta 3$ y $\alpha\text{V}\beta 5$. El ensayo de migración fue llevado a cabo según se describió en Métodos, y las células fueron dejadas migrar durante 6 h. LM609 y P1F6 son mAbs dirigidos hacia $\alpha\text{V}\beta 3$ $\alpha\text{V}\beta 5$, respectivamente. Los datos mostrados en la Figura 17 fueron normalizados para porcentaje de control (sin anticuerpo), el cual fue considerado como 100%, y cada barra es el término medio de tres filtros transpozo (+/- SD). BSA, IgG de ratón y IgG humano sirvieron como controles negativos. LM609-P1F6 representa combinaciones de ambos anticuerpos. Los anticuerpos y BSA fueron utilizados a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 18 A-E. Migración de HUVECS hacia 2% de FBS. El ensayo de migración fue dejado proceder durante 4 h y el dato fue capturado como se describe en Métodos. La Figura 18(A) es una representación gráfica de

LM609+P1F6, el isotipo se equiparó con anticuerpos de control (humanos y de ratón). Los anticuerpos y proteínas fueron utilizados a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La figura 18(B) es una representación gráfica de migración de células en presencia de ReoPro y GenO95. Fotomicrografías son campos representativos (lente objetivo 10x) de migración de células en la Figura 18(C), la ausencia de anticuerpo, Figura 18(D), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), y Figura 18(E), GenO95 (20 $\mu\text{g/ml}$). Los datos fueron normalizados a porcentaje de control (ningún anticuerpo) lo cual fue considerado como 100% y cada punto es el promedio de tres filtros de transpozó (+/- SD).

10

Figura 19 A-E. Migración de células A375S.2 hacia 10% de FBS. El ensayo de migración fue dejado proceder durante 4 h y los datos fueron capturados según se describió en Métodos. Se utilizaron anticuerpos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 19(A) es una representación gráfica de migración de células en presencia de concentraciones variantes de GenO95. La Figura 19(B) es una representación gráfica de migración de células en presencia de LM609, P1F6, combinación de LM609+P1F6, anticuepros de control correspondidos con isotipo (humanos y de ratón). Los datos fueron normalizados a porcentaje de control, lo cual es considerado como 100% y cada punto es el promedio de tres filtros de transpozó (+/-SD). Fotomicrografías son campos representativos (lente objetivo 10x) de migración de célula en la Figura 19(C), ausencia de anticuerpo, Figura 19(D), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), y Figura 19(E), GenO95 (20 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 20 A-E. Migración de HUVECS hacia vitronectin en presencia de bFGF. Los lados inferiores de filtros de cámara de migración fueron recubiertos con 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectin, y el ensayo fue llevado a cabo como se describe en Métodos. Las células fueron dejadas migrar durante 6 h. En la Figura 20 A-E, cada punto de datos es el promedio de 3 filtros de transpozo (+/-SD). La Figura 20(A), bFGF; Figura 20(B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$); Figura 20(C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$); Figura 20(D), no-bFGF. La Figura 20(E), inhibición de migración de células en presencia de varios anticuerpos se muestra gráficamente.

10

Figura 21 A-D. Invasión de células A375S.2 a través de un gel de fibrina (5 mg/ml). Se dejó proceder un ensayo de invasión durante 24 horas y se capturaron datos como se describe en métodos. Fotomicrografías son representativas de campos (lente objetivo 4x) de invasión de células en la Figura 21(A) la ausencia de anticuerpos, Figura 21(B) GenO95 (10 $\mu\text{g/ml}$), Figura 21(C) y (D) son representación gráfica de invasión de células en presencia de GenO95, 10E5 F(ab')₂, LM609, P1F6, LM-P1F6 (LM609+P1F6), humano y ratón IgGs (H-IgG y M-IgG). Gráfica de la Figura 21(D): la concentración de todos los anticuerpos y proteínas es 10 $\mu\text{g/ml}$. Los datos fueron normalizados hasta porcentaje de control (ningún anticuerpo) el cual fue considerado como 100%, y cada punto es el promedio de tres filtros de transpozo (+/-SD).

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención suministra recombinante aislado y/o anticuerpos sintéticos integrin duales humanos, de primate, roedor, mamífero, quimérico, humanizado o CDR-injertado y anticuerpos integrin duales anti-idiotipo, para los mismos, así como también composiciones y moléculas de ácido nucleico codificantes que comprenden por lo menos un polinucleotido que codifica por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual o anticuerpo anti-idiotipo. La presente invención incluye adicionalmente, pero no está limitada a ello, métodos de hacer y usar tales ácidos nucleicos y anticuerpos y anticuerpos anti-idiotipo, que incluyen composiciones, métodos y dispositivos de diagnóstico y terapéuticos.

Tal como aquí se usa, un "anticuerpo anti-alfa-v-beta3, alfa-v-beta5 dual integrin", "anticuerpo integrin anti-dual", "porción de anticuerpo integrin anti-dual", o "fragmento de anticuerpo integrin anti-dual" y/o "variante de anticuerpo de integrin anti-dual" y similares incluyen cualquier molécula que contenga proteína o péptido que comprenda por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero no limitada a por lo menos una región determinante complementaria (CDR) de cadena pesada o liviana o una porción de ligadura de ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o de cadena liviana, una región constante de cadena pesada o de cadena liviana, una región de estructura, o cualquier porción de la

invención. Tal anticuerpo opcionalmente afecta adicionalmente un ligando específico, tal como pero no está limitado a en donde tal anticuerpo modula, disminuye, aumenta, antagoniza, agoniza, mitiga, inhibe, abroga y/o interfiere por lo menos con una actividad de integrin dual u obligatoria o con actividad receptora de integrin dual u obligatoria *in vitro*, *in situ*, y/o *in vivo*. Como un ejemplo no limitativo, un anticuerpo integrin anti-dual adecuado, la porción especificada o variante de la presente invención puede atar por lo menos un integrin dual, o porciones especificadas, variantes o dominios de la misma. Un anticuerpo integrin anti-dual adecuado, porción especificada o variante puede afectar también opcionalmente al menos una actividad o función integrin dual tal como pero no limitada a, ARN, ADN o síntesis de proteínas, y desprendimiento integrin dual, señalización receptora integrin dual, división integrin dual de membrana, actividad de integrin dual, producción y/o síntesis de integrin dual. El término "anticuerpo" se destina adicionalmente a abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones especificadas y sus variantes, que incluyen anticuerpo mimético o porciones formadas por anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo especificado o porción del mismo que incluyen anticuerpos de una sola cadena y fragmentos del mismo. Fragmentos funcionales incluyen fragmentos que ligan antígenos que ligan a un integrin dual de mamífero. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos capaces de ligarse a integrin dual o sus porciones, incluyen, pero no están limitados a Fab por ejemplo, mediante digestión de papaína), Fab' (por ejemplo, mediante digestión de

ejemplo, mediante digestión de pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, mediante digestión de pepsina, reducción parcial y reagregación), fragmentos Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular), están cubiertos por la invención (véase, por ejemplo, Colligan, 5 Immunology, Supra).

Tales fragmentos pueden ser producidos mediante división enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se muestra en el arte y/o según aquí se describe, anticuerpos también pueden ser producidos en 10 una variedad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpo en los cuales uno o más codones de detención han sido introducidos hacia el lado de entrada del sitio natural de detención. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica una porción de cadena pesada $F(ab')_2$ puede ser diseñada para incluir esquemas de ADN que codifican el dominio de CH_1 y/o 15 región de charnela de la cadena pesada. Las diferentes porciones de anticuerpos pueden ser unidas químicamente entre sí mediante técnicas convencionales, o pueden ser preparadas como una proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética.

20 Tal como aquí se utiliza, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el cual sustancialmente toda parte de proteína (por ejemplo, CDR, estructura, dominios C_L , C_H , (por ejemplo, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), charnela, (V_L , V_H)) es sustancialmente no inmunogénica en humanos,

chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, uña de guinea, hamster y similares) y otros animales designan tales anticuerpos específicos de especies, sub-género, género, sub-familia, familia. Adicionalmente, anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores.

- 5 Tales cambios o variaciones opcionalmente y de preferencia requieren o reducen la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies con relación a anticuerpos no modificados. De esta manera, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido mediante un animal no humano o
- 10 célula procariótica o eucariótica que es capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reordenada (por ejemplo, de cadena pesada y/o de cadena liviana). Adicionalmente, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena sencilla, este puede comprender un péptido conector que no es encontrado en anticuerpos
- 15 humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido conector, tal como dos hasta aproximadamente ocho residuos de glicina u otros residuos de aminoácido, que conectan la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana. Tales péptidos conectores son considerados que son de origen humano.

20

Anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares también pueden ser utilizados que son monoclonales, de preferencia humanos o humanizados, anticuerpos que tiene especificidades

dual, la otra es para cualesquier otro antígeno. Métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada-cadena liviana, en donde la dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1983)). Por razón del surtido al azar de inmunoglobulina de cadena pesada y liviana, estos hidridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta que usualmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es más bien problemática, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares son expuestos, por ejemplo, en WO 93/08829, Patentes Estadounidenses Nos. 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, la WO 91/00360, WO 92/00373, la EP 03089, Traunecker y colaboradores, EMBO J. 10:3655 (1991), Suresch y colaboradores, Métodos en Enzimología 121:210 (1986), cada una incorporada aquí completamente por vía de referencia.

20

Anticuerpos de integrin anti-duales (designados también anticuerpos de integrin duales) útiles en los métodos y composiciones de la presente invención opcionalmente pueden ser caracterizados por alta afinidad que

56
59

la invención, en donde los componentes individuales, tales como la región variable, la región constante y la estructura, individualmente y/o colectivamente, poseen individualmente y de preferencia baja inmunogenicidad, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que
5 pueden ser utilizados en la invención están opcionalmente caracterizados por su capacidad para tratar pacientes durante períodos prolongados con alivio medible de síntomas y baja y/o aceptable toxicidad. Inmunogenicidad baja o aceptable y/o alta afinidad, así como también otras propiedades adecuadas puede contribuir a los resultados terapéuticos logrados. "Baja
10 inmunogenicidad" es definida aquí como levantando respuestas HAH, HACA o HAMA significativas en menos de aproximadamente 75%, o preferentemente menos de aproximadamente 50% de los pacientes tratados y/o elevando bajos títulos en el paciente tratado (menos de aproximadamente 300, de preferencia, menos de aproximadamente 100
15 medidos con un inmunoensayo doble de enzimas de antígeno) (Elliott, y colaboradores, Lancet 344: 1125-1127 (1994), incorporado aquí completamente por vía de referencia.

Utilidad

20 Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden ser utilizados para la producción de por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual o variante especificada del mismo, que puede ser utilizado para medir o efectuar en una célula, tejido, órgano o animal (incluyendo mamíferos y

de integrin dual, seleccionada entre, pero no limitada a, al menos uno de un desorden o enfermedad inmune, un desorden o enfermedad cardiovascular, un desorden o enfermedad infecciosa, maligna, y/o neurológica, u otra condición relacionada conocida u integrin dual especificada.

5

Tal método puede comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o una composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual a la célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento, alivio, prevención o
10 reducción en síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad efectiva puede comprender una cantidad de aproximadamente 0,001 a 500 mg/kg por individuo, (por ejemplo, píldora grande) administración múltiple o continua o para lograr una concentración de suero de 0,01-5000 $\mu\text{g/ml}$ de
concentración de suero por individuo, múltiple o administración continua, o
15 cualquier intervalo o valor efectivo en el mismo, según se hace y se determina utilizando métodos conocidos, según aquí se describe o se conoce en las técnicas pertinentes.

Citaciones

20

Todas las publicaciones o patentes aquí citadas son incorporadas completamente aquí por vía de referencia puesto que ellas muestran el estado de la técnica en el momento de la presente invención y/o para proveer descripción y capacitación de la presente invención. Las

medio, incluyendo todos los formatos registrados, electrónicos o impresos. Las siguientes referencias son completamente incorporadas aquí por referencia: Ausubel, y colaboradores, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook y
5 colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^{da} Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan y colaboradores, eds., Current
Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan y colaboradores, Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons,
10 NY, NY, (1997-2001).

Anticuerpos de la presente invención

Por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual de la presente invención
puede ser producido opcionalmente por una línea celular, una línea celular
15 mixta, una célula o población clonal inmortalizada de células inmortalizadas,
como es bien sabido en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel, y
colaboradores, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &
Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook y colaboradores, Molecular
Cloning: A Laboratory Manual, 2^{da} Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989);
20 Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY
(1989); Colligan y colaboradores, eds., Current Protocols in Immunology,
John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan y colaboradores, Current
Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), cada

Anticuerpos humanos que son específicos para proteínas integrin humanas duales o fragmentos de las mismas pueden ser levantadas contra un antígeno inmunogénico apropiado, tal como proteína de integrin aislada y/o dual o una porción de la misma (que incluye moléculas sintéticas, tales como péptidos sintéticos). Otros anticuerpos de mamíferos específicos o generales pueden ser levantados de manera similar. Preparación de antígenos inmunogénicos, y producción de anticuerpos monoclonales pueden ser llevadas a cabo utilizando cualquier técnica adecuada.

- 10 En un enfoque, un hibridoma es producido utilizando una línea celular adecuada inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero no limitada a estas, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO; Ns1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2, SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60,
- 15 MLA 144, NAMAWA, NEURO 2A, o similares, o heteromielomas, productos de fusión de las mismas, o cualquier célula o célula de fusión derivada de la misma, o cualesquier otra línea celular adecuada según se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, y similares, con células de producción de anticuerpos, tales como, pero no están
- 20 limitados a los mismos, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdala u otras células inmunes o células que contengan células B o cualquier otras células que expresen cadena pesada o liviana constante o variable o estructura o secuencias de CDR, ya sea como ácido nucleico

roedor, equino, ovino, cabra, oveja, primate, ADN genómico eucariótico, cADN, rADN, ADN o ARN mitocondriales, Adn o ARN de cloroplasto, hnARN, mARN, tARN, de hebra sencilla, doble o triple, hibridizada, y similares o cualquier combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, 5 Ausubel, supra, y Colligan, Immunology, supra, capítulo 2, incorporado aquí completamente por vía de referencia.

Células que producen anticuerpos también pueden ser obtenidas a partir de la sangre periférica, o, de preferencia del bazo o los nodos 10 linfáticos, de humanos o de otros animales adecuados que han sido inmunizados con el antígeno de interés. Cualesquier otra célula huésped adecuada también puede ser utilizada para expresar ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento o variante especificada del mismo, de la presente invención. Las células fundidas 15 (hibridomas) o células recombinantes pueden ser aisladas utilizando condiciones selectivas de cultivo u otros métodos conocidos adecuados, y clonadas limitando la dilución o almacenando células, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden ser seleccionadas mediante un ensayo adecuado (por 20 ejemplo, ELISA).

Otros métodos adecuados de producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida pueden ser utilizados, incluyendo, pero no limitados

bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, cADN, y similares, librería de exposición; por ejemplo, como se encuentran disponibles desde Tecnologías de Anticuerpos de Cambrigde, Cambridgeshire, U.K; MorphoSYs, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, 5 Lund, Suecia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Véase por ejemplo, EP 368.684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; 10 PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4.704.692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); o péptidos o proteínas generados estocásticamente – US 5723323, 5763192, 5814476, 15 5817483, 5824514, 5976862, WO86/05803, EP 590 689 (Ixsys; ahora Applied Molecular Evolution (AME), cada una incorporada aquí completamente por vía de referneceia) o que conflan en inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen y colaboradores, Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu y colaboradores, Crit. Rev. 20 Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren y colaboradores, Immunol. 93:154-161 (1998), cada uno incorporado aquí completamente por vía de referencia así como también las patentes y solicitudes relacionadas) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la

- Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (mayo 1997); Hanes y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (noviembre de 1998)); tecnologías de producción de anticuerpos de una sola célula (por ejemplo, método seleccionado de anticuerpo de linfocito ("SLAM") (Patente estadounidense No. 5.627.052, Wen y colaboradores, J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); microgotica de gel y citometría de flujo (Powell y colaboradores, Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray y colaboradores, J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny y colaboradores, Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); Selección de células B (Steenbakkers y colaboradores, Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak y colaboradores, Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda (1988)).
- 15 Métodos para ingeniería o humanización de anticuerpos no humano s o humanos se pueden utilizar también y son suficientemente conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado o manejado técnicamente tiene uno o más residuos de aminoácidos provenientes de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no limitados a, ratón, rata, conejo, primate no
- 20 humano u otros mamíferos. Estos residuos de aminoácidos humanos frecuentemente se designan como residuos de "importación" los cuales típicamente son tomados de una variable de "importación", constante u otro dominio de una secuencia humana conocida. Secuencias humanas Ig

65
66

- www.sciquest.com/;
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;
www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;
- 5 www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/;
- 10 pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
- 15 www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac.net.org/sites_geo.html;
aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/Immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
- 20 imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html;
antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;

www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;

www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;

www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;

www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat y

5 colaboradores, Sequences of Proteins of immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada una incorporada aquí completamente por vía de referencia.

Tales secuencias importadas pueden ser utilizadas para reducir
10 inmunogenicidad, o reducir, mejorar o modificar conexión, afinidad, en-
proporción, fuera de-proporción, avidez, especificidad, vida media, o
cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. En
general parte o todas las secuencias no humanas o humanas de CDR son
mantenidas en tanto que las secuencias no humanas de regiones variables y
15 constantes son reemplazadas con aminoácidos humanos u otros. Los
anticuerpos opcionalmente pueden ser también humanizados con retención
de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables.
Para lograr esta meta, opcionalmente se pueden preparar anticuerpos
humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales
20 y diferentes productos humanizados conceptuales que utilizan tres modelos
dimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Tres modelos
dimensionales de inmunoglobulina se encuentran comúnmente disponibles y
son familiares para aquellos expertos en la materia. Programas de

seleccionadas candidato de inmunoglobulina. La inspección de estas exhibiciones permite análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidato de inmunoglobulina, es decir, el análisis de residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidato a ligar su imagen. En esta forma, residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados desde el consenso y secuencias de significado de tal manera que las características de anticuerpo deseadas, tales como afinidad incrementada por el antígeno o antígenos objetivo, es archivada. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar ligamento de antígenos. Humanización o técnica de anticuerpos de la presente invención puede ser llevada a cabo utilizando cualquier método conocido, tal como, pero no limitado a estos descritos en, Winter (Jones y colaboradores, Nature 321:522 (1986); Riechmann y colaboradores, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen y colaboradores, Science 239:1534 (1988)), Sims y colaboradores, J.Immunol. 151:2296 (1993); Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), carter y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); presta y colaboradores, J. Immunol. 151:2623 (1993), Patentes estadounidenses Nos.: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, cada una completamente incorporada aquí por

El anticuerpo integrin anti-dual también puede ser opcionalmente generado mediante inmunización de un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, hámster, primate no humano, y animales similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, según aquí se describe y/o

5 según se sabe en la técnica. Células que producen un anticuerpo integrin anti-dual humano puede ser aisladas desde tales animales e inmortalizadas utilizando métodos adecuados, tales como los métodos aquí descritos.

Ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de
10 anticuerpos humanos que se ligan a antígenos humanos pueden ser producidos mediante métodos conocidos (por ejemplo, pero no limitados a estos, patentes estadounidenses Nos.: 5.770.428, 5.569.825, 5.545.806, 5.625.126, 5.625.825, 5.633.425, 5.661.016, y 5.789.650 expedidas a Lonberg y colaboradores; Jakobovits y colaboradores WO 98/50433,
15 jakobovits y colaboradores WO 98/24893, Longberg y colaboradores WO 98/24884, Lonberg y colaboradores WO 97/13852, Longberg y colaboradores WO 94/ 25585, Kucherlapate y colaboradores WO 96/34096, Kucherlapate y colaboradores EP 0463 151 B1, Kucherlapate y colaboradores EP 0710 719 A1, Surani y colaboradores patente
20 estadounidense No. 5.545.807, Bruggemann y colaboradores WO 90/04036, Bruggemann y colaboradores EP 0438 474 B1, Longberg y colaboradores EP 0814 259 A2, Logberg y colaboradores GB 2 272 440 A, Longberg y colaboradores *Nature* 368:856-859 (1994), Taylor y colaboradores, Int.

Taylor y colaboradores Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Tuallion y colaboradores, proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993), Longberg y colaboradores, Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) y Fishwald y colaboradores Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996), los cuales se
 5 encuentran completamente incorporados aquí por vía de referencia). En general, estos ratones comprenden al menos uno transgénico que comprende ADN proveniente de al menos un lugar de inmunoglobulina humana que está funcionalmente reordenado, o el cual puede sufrir rearreglo funcional. Los sitios de inmunoglobulina endógena en tales ratones
 10 pueden ser desorganizados o suprimidos para eliminar la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

Cribado de anticuerpo para ligamiento específico a proteínas o fragmentos similares puede ser logrado convenientemente utilizando
 15 librerías de exhibición de péptidos. Este método implica el tamizado de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tienen la función o estructura deseada. Tamizado de anticuerpos de péptidos exhiben librerías suficientemente conocidas en la técnica. Las secuencias de péptidos exhibidos pueden ser desde 3 hasta 5000 o más aminoácidos de
 20 longitud, frecuentemente desde 5-100 aminoácidos de longitud, y más frecuentemente desde alrededor de 8 hasta 25 aminoácidos de longitud. Además de los métodos sintéticos químicos directos para generar librerías de péptidos, varios métodos de ADN recombinante han sido descritos. Un

de nucleótidos que codifica la secuencia de péptidos particulares exhibidos. Tales métodos están descritos en la publicación de patente del PCT Nos. 91/17271, 91/18980, 91/19818, y 93/08278. Otros sistemas para generar librerías de péptidos tienen aspectos tanto de síntesis química in vitro como

5 de métodos recombinantes. Véase, la publicación de patentes del PCT Nos. 92/05258, 92/14843, y 96/19256. Véanse también las patentes estadounidenses Nos. 5.658.754; y 5.643.768. El péptido exhibe librerías, vectores, y estuches de tamizado que se encuentran comercialmente disponibles desde proveedores tales como Invitrogen (Carlsbad, CA), y

10 Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidense Nos. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, cedidas a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, cedidas a Dyax, 5427908, 5580717, cedidas a Affymax; 5885793, cedida a

15 Cambridge Antibody Technologies; 5750373, cedida a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, cedidas a Xoma, Colligan, supra; Ausubel, supra; o Sambrook, supra, cada una de las patentes y publicaciones anteriores incorporadas completamente aquí por vía de referencia.

20

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser preparados utilizando al menos un anticuerpo integrin anti-dual que codifica ácido nucleico para proveer animales o mamíferos transgénicos, tales como

conocidos. Véanse, por ejemplo, pero sin estar limitados a, patentes estadounidenses Nos. 5.827.690, 5.849.992, 4.873.316, 5.994.616, 5.565.362, 5.304.489, y similares, cada una de las cuales se incorpora aquí completamente por vía de referencia.

5

Los anticuerpos de la presente invención adicionalmente se pueden preparar utilizando por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual que codifica ácido nucleico para proveer plantas transgénicas y células cultivadas de plantas (por ejemplo, pero no están limitadas a tabaco y maíz), que
10 producen tales anticuerpos, porciones especificadas o variantes en las partes de planta o en células cultivadas a partir de las mismas. Como un ejemplo no limitativo, las hojas de tabaco transgénico que expresan proteínas recombinantes han sido utilizadas con éxito para proveer grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, utilizando un promotor
15 inducible. Véase, por ejemplo, Cramer y colaboradores, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999) y las referencias allí citadas. También, maíz transgénico ha sido utilizado para expresar proteínas animales a niveles de producción comerciales, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes
20 naturales. Véase, por ejemplo, Hood y colaboradores, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) y las referencias allí citadas. Anticuerpos han sido producidos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas que incluyen fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos

109 (1998) y la referencia allí citada. De esta manera, anticuerpos de la presente invención también pueden ser producidos utilizando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos. Véanse también, por ejemplo, Fischer y colaboradores, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (Oct. 5 1999), Ma y colaboradores, *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma y colaboradores, *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitelam y colaboradores, *Biochem Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); y las referencias allí citadas. Véase, también en general para expresión de plantas de anticuerpos, pero no limitados a, cada una de las referencias incorporada aquí por vía de referencia.

Los anticuerpos de la invención pueden ligar integrin dual humano con un amplio intervalo de afinidades (K_D). En una modalidad preferida, al menos un mAb humano de la presente invención pueden ligar opcionalmente integrin dual humano con alta afinidad. Por ejemplo, un mAb humano puede ligar integrin dual humano con un K_D igual o menor que aproximadamente 10^{-7} M, tal como pero no limitado a, 0,1 – 9,9 (o cualquier intervalo o valor en el mismo) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-12} , 10^{-13} , ó cualquier intervalo o valor en el mismo.

20

La afinidad o aidez de un anticuerpo por un antígeno puede ser determinada experimentalmente utilizando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky y colaboradores, "Antibody-Antigen

Compañía: nueva York, NY (1992); y los métodos aquí descritos). La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal, pH). De esta manera, las medidas de afinidad y otros parámetros que unen
 5 antígeno (por ejemplo, KD, K2, Kd) son hechas de preferencia con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y una solución buffer estandarizada, tal como el buffer aquí descrito.

Moléculas de Ácido Nucleico

10 Utilizando la información aquí suministrada, tal como las secuencias de nucleótidos que codifican por lo menos 70-100% de los aminoácidos contiguos de por lo menos uno de SEQ ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ?
fragmentos especificados, variantes o sus secuencias de consenso, o un
vector depositado que comprende por lo menos una de estas secuencias,
 15 una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica al menos un anticuerpo integrin anti-dual puede ser obtenida utilizando métodos aquí descritos o como se conocen en la técnica.

Moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en
 20 la forma de ARN, tales como mARN, hnARN, tARN o cualquier otra forma, o
en la forma de ADN, incluyendo, pero sin estar limitados a, cADN y ADN
 genómico obtenido por clonación o producidos sintéticamente o cualquier combinaciones de los mismos. El ADN puede ser de triple hebra, de doble

codificadora, conocida también como la hebra de sentido, o puede ser la hebra no codificadora, designada también como la hebra de anti-sentido.

Moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención pueden

5 incluir moléculas de ácido nucleico que comprende una estructura de lectura abierta (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero no limitados a ello, por lo menos una porción especificada de al menos un CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada (por ejemplo SEQ ID Nos. 1-3) o cadena liviana (por ejemplo, SEQ ID Nos. 4-6);

10 moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificadora para un anticuerpo integrin anti-dual o región variable (por ejemplo, SEQ ID Nos. 7-8); y moléculas de ácido nucleico las cuales comprenden una secuencia de nucleótido sustancialmente diferente de aquellas descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifica por

15 lo menos un anticuerpo integrin anti-dual según aquí se describe y/o como se conoce en la técnica. Naturalmente, el código genético es bien conocido en la técnica. De esta manera, sería rutina para un experto en la técnica generar tales variantes de ácido nucleico degeneradas que codifican para anticuerpos específicos de integrin anti-duales de la presente invención.

20 Véase, por ejemplo, Ausubel y colaboradores; supra, y tales variantes de ácido nucleico son incluidas en la presente invención. Ejemplos no limitativos de moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyen SEQ ID NOS: 10, 11, 12, 13, 14, 15, que corresponden a ejemplos no

CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, región variable HC y región variable LC.

En otro aspecto, la invención provee moléculas de ácido nucleico
5 aislado que codifica a(n) anticuerpo integrin anti-dual que tiene una
secuencia de aminoácido según es codificada por el ácido nucleico,
contenido en el plásmido depositado según se designa con los nombres de
clon _____ y Depósitos de
ATCC Nos. _____,
10 respectivamente depositado en _____.

Tal como aquí se indica, moléculas de ácido nucleico de la presente
invención que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo
integrin anti-dual pueden incluir, pero no están limitadas a, aquellos que
15 codifican la secuencia de aminoácido de un fragmento de anticuerpo, por sí
mismo; la secuencia que codifica para el anticuerpo completo o una porción
del mismo; la secuencia que codifica para un anticuerpo, fragmento o
porción, así como también secuencias adicionales, tales como la secuencia
que codifica de al menos un guiador de señal o péptido de fusión, con o sin
20 la secuencias codificadoras adicionales antes mencionadas, tal como al
menos un intrón, junto con secuencias adicionales, que no-codifican,
incluyendo pero limitado a secuencias 5' y 3' no codificadoras, tales como
las secuencias transcritas, no traducidas que desempeñan un papel en la

de mRNA); una secuencia codificadora adicional que codifica para aminoácidos adicionales, tales como aquellos que proporcionan funcionalidades adicionales. De esta manera, la secuencia que codifica un anticuerpo puede ser fundida a una secuencia marcadora, tal como una
5 secuencia que codifica un péptido que facilita purificación del anticuerpo fundido que comprende un fragmento o porción de anticuerpo.

Polinucleótidos que hibridizan selectivamente a un polinucleótido según aquí se describe

10 La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que hidrolizan bajo condiciones de hibridación selectivas hasta un polinucleótido aquí expuesto. De esta manera, los polinucleótidos de esta modalidad pueden ser utilizados para aislar, detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden tales polinucleótidos. Por ejemplo, polinucleótidos de la
15 presente invención pueden ser utilizados para identificar, aislar, o amplificar clones parciales o de longitud total en una librería depositada. En algunas modalidades, los polinucleótidos son genómicos o secuencias aisladas de cADN, o de otra manera complementarios a, un cADN proveniente de una librería de ácido nucleico de humanos o mamíferos.

20

De preferencia, la librería de cADN comprende por lo menos 80% de secuencias de longitud completa, de preferencia por lo menos 85% o 90% de secuencias de longitud completa, y con mayor preferencia por lo menos

o moderadas condiciones de hibridación de severidad son típicamente, pero no exclusivamente, empleadas con secuencias que tienen una identidad reducida de secuencia con relación a secuencias complementarias. Condiciones de severidad moderadas y altas pueden ser empleadas
5 opcionalmente para secuencias de mayor identidad. Condiciones de baja severidad permiten hibridación selectiva de secuencias que tienen identidad de secuencia de aproximadamente 70% y pueden ser empleadas para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

10 Opcionalmente, polinucleótidos de esta invención condicionarán por lo menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos aquí descritos. Los polinucleótidos de esta invención abarcan secuencias de ácido nucleico que pueden ser empleadas para hibridización selectiva a un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Véase,
15 por ejemplo, Ausubel, supra; Colligan, supra, cada uno incorporado enteramente aquí por vía de referencia.

Construcción de Ácidos Nucleicos

El ácido nucleico aislado de la presente invención puede ser hecho
20 utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de las mismas, como bien conocidas en el arte.

ejemplo, un sitio de mutli-clonación que comprende uno o más sitios de restricción de endonucleasa pueden ser insertados dentro del ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. También, secuencias trasladables pueden ser insertadas para ayudar en el aislamiento del polinucleótido trasladado de la presente invención. Por ejemplo, una
5 secuencia marcadora de haxa-histidina provee un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención- que excluye la secuencia codificadora – opcionalmente es un vector, adaptador o vinculador para clonación y/o expresión de un
10 polinucleótido de la presente invención.

Secuencias adicionales pueden ser agregadas a tales secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la
15 introducción del polinucleótido dentro de una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores, y conectores es suficientemente conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel, supra; o Sambrook, supra).

20 **Métodos Recombinantes para Construir Ácidos Nucleicos**

Las composiciones de ácido nucleico aisladas de esta invención, tales como ARN, cADN, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos, puede ser obtenida a partir de una fuente biológica utilizando cualquier

oligonucleótido que hibridizan selectivamente, bajo condiciones severas, a los polinucleótidos de la presente invención son utilizados para identificar la secuencia deseada en una cADN o librería de ADN genómico. El aislamiento de ARN, y construcción de cADN, y librerías genómicas, es bien conocido para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra; o Sambrook, supra).

Cribado de Ácido Nucleico y Métodos de Aislamiento

Un cADN o librería genómica puede ser cribada utilizando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, tales como aquellos aquí descritos. Se pueden utilizar sondas para hibridizar con secuencias genómicas de ADN o cADN para aislar genes homólogos en el mismo o en diferente organismo. Aquellos de experiencia en el arte apreciarán que varios grados de severidad de hibridación pueden ser empleados en el ensayo; y ya sea la hibridación o el medio de lavado puede ser severo. A medida que las condiciones para hibridación se tomen más severas, debe existir un mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para que ocurra la formación dúplex. El grado de severidad puede ser controlado mediante una o más de la temperatura, intensidad iónica, pH y la presencia de un solvente parcialmente desnaturizante tal como formamida. Por ejemplo, la severidad de hidridación es variada convenientemente cambiando la polaridad de la solución reactiva a través de, por ejemplo, manipulación de la concentración de formamida dentro del

severidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente de 100%, o 70-100% o cualquier intervalo o valor en el mismo. No obstante, debe entenderse que variaciones menores de secuencia en las sondas y detonadores puede ser compensada
5 reduciendo la severidad de la hibridización y/o medio de lavado.

Métodos de aplicación de ARN o ADN son suficientemente conocidos en la técnica y pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención sin experimentación indebida, con base en la enseñanza asesoramiento aquí
10 presentados.

Métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no están limitados a ellos, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionado (véase, por ejemplo, las patentes
15 estadounidenses Nos. 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188 otorgadas a Mullis, y colaboradores; 4.795.699 y 4.921.794 otorgada a Tabor y colaboradores; 5.142.033 otorgada a Innis; 5.122.464 otorgada a Wilson y colaboradores; 5.091.310, otorgado a Innis; 5.066.584 otorgada a Gyllensten y colaboradores; 4.889.818 otorgada a Gelfand y colaboradores; 4.994.370
20 otorgada a Silver y colaboradores; 4.766.067 otorgada a Biswas; 4.656.134 otorgada a Ringold) y amplificación arbitrada de ARN que utiliza ARN anti-sentido hacia la secuencia objetivo como una plantilla para síntesis de ADN de doble trenzado (Patente estadounidense No. 5.130.238 otorgada a Malek

completos de las respectivas referencias se incorporan aquí por vía de referencia. (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra; o Sambrook, supra).

Por ejemplo, tecnología de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

5 puede ser utilizada para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y genes relacionados directamente desde librerías genómicas de ADN o cADN. PCR y otros métodos de amplificación in vitro también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas para ser expresadas, para hacer

10 ácidos nucleicos para usarse como sondas para detectar la presencia de la mRNA deseada en las muestras, para secuenciar ácido nucleico, o para otras finalidades. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir personas de experiencia a través de métodos de amplificación in vitro se encuentran en Berger, supra, Sambrook, supra, y Ausubel, supra, así como también en

15 Mullis y colaboradores, Patente estadounidense No. 4.683.202 (1987); e Innis y colaboradores, PCR Protocols A Guide to methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Estuches comercialmente disponibles para amplificación genómica de PCR son conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech).

20 Adicionalmente, por ejemplo, el gen T4 proteína 32 (Boehringer Mannheim) puede ser utilizado para mejorar el rendimiento de productos largos de PCR.

Métodos Sintéticos para Construir Ácidos Nucleicos

conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, y colaboradores, supra). La síntesis química generalmente produce un oligonucleótido de una sola hebra, el cual puede ser convertido en ADN de doble hebra mediante hibridización con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una polimerasa de ADN utilizando la hebra única como una plantilla. Alguien de experiencia en la técnica reconocerá que mientras la síntesis química de ADN puede ser limitada a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, secuencias más largas pueden ser obtenidas mediante la ligación de secuencias más cortas.

10

Cartuchos de Expresión Recombinante

La presente invención proporciona adicionalmente cartuchos de expresión recombinante que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Una secuencia de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo una secuencia de cADN o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo de la presente invención, puede ser utilizada para construir un cartucho de expresión recombinante que puede ser introducido dentro de al menos una célula huésped deseada. Un cartucho de expresión recombinante comprenderá típicamente un polinucleótido de la presente invención operablemente vinculado a secuencias reguladoras de iniciación transcripcional que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula huésped dedicada. Tanto promotores heterólogos como promotores no heterólogos (es decir, endógenos) pueden ser utilizados para dirigir

15

20

En algunas modalidades, ácidos nucleicos aislados que sirven como promotores, mejoradores, u otros elementos pueden ser introducidos en la posición apropiada (hacia el lado de entrada, hacia el lado de salida o en introducción) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención de tal manera como para regular hacia arriba o hacia abajo la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, promotores endógenos pueden ser alterados in vivo o in vitro por mutación, supresión y/o sustitución.

10 **Vectores y células huésped**

La presente invención se relaciona también con vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aislado de la presente invención, células huésped que están genéticamente diseñadas con los vectores recombinantes, y la producción de al menos un anticuerpo integrin anti-dual por técnicas recombinantes, tal como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y colaboradores; supra; Ausubel y colaboradores; supra, cada una completamente incorporada aquí por vía de referencia.

Los polinucleótidos opcionalmente pueden estar unidos a un vector que contiene un marcador seleccionable para propagación en un huésped. En general, un vector plásmido es introducido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede ser empacado in vitro utilizando una línea

El inserto de ADN debe estar articulado operativamente con un promotor apropiado. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para iniciación, terminación de transcripción y, en la región transcrita, un ribosoma que une sitios para traducción. La porción
5 codificadora de las copias acabadas expresada por las construcciones incluirá de preferencia una traducción que se inicia al principio y una tripleta de nucleótidos de terminación (por ejemplo, UAA, UGA, o UAG) ubicada apropiadamente al final del mRNA que ha de ser traducido, siendo preferidos UAA y UAG para mamíferos o células eucarióticas de expresión.

10

Los vectores de expresión incluirán de preferencia pero opcionalmente por lo menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero no están limitados a, metotrexato (MTX), reductasa de dihidroftalato (DHFR, Patentes estadounidenses Nos.
15 4.399.216, 4.634.665, 4.656.134, 4.956.288, 5.149.636, 5.179.017, ampicilina, neomicina (G418) ácido micofenólico, o cintaza de glutamina (GS, Patentes estadounidenses Nos. 5.122.464, 5.770.359, 5.827,739) de resistencia para cultivo de células eucarióticas, y genes de resistencia de tetraciclina o ampicilina para cultivar en E.Coli y otras bacterias o
20 procarióticas. (las patentes anteriores son incorporadas enteramente aquí por vía de referencia). Medio de cultivo y condiciones apropiadas para las células huésped antes descritas son conocidos en la técnica. Vectores adecuados serán con facilidad aparentes para el artesano experto. La

transferencia intervenida por DEAE-dextrano, transferencia ajustada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Tales métodos están descritos en la técnica, tales como Sambrook, supra, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, supra, Capítulos 1, 9, 13, 5 15, 16.

Al menos un anticuerpo de la presente invención puede ser expresado en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solamente señales de secreción, sino también regiones funcionales 10 heterólogas adicionales. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, puede ser agregada a la N-terminación de un anticuerpo para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante manejo y almacenamiento subsiguientes. También, porciones de péptido pueden ser 15 agregadas a un anticuerpo de la presente invención para facilitar purificación. Tales regiones pueden ser retiradas antes de la preparación final de un anticuerpo o al menos un fragmento del mismo. Tales métodos son descritos en mucho manuales estándar de laboratorio, tales como Sambrook, supra, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, supra, 20 capítulos 16, 17, y 18.

Aquellos de experiencia ordinaria en la materia están bien informados de los numerosos sistemas de expresión disponibles para expresión de un

Alternativamente, ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser expresados en una célula huésped conectando (por manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos son suficientemente conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en las patentes estadounidenses Nos. 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y 5.733.761, incorporadas aquí completamente por vía de referencia.

Cultivo de células ilustrativo para la producción de anticuerpos, porciones especificadas o variantes de las mismas son células de mamífero. Sistemas de células de mamíferos frecuentemente estarán en la forma de monocapas de celdas aunque suspensiones o biorreactores de células de mamíferos también pueden ser utilizadas. Un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de expresar proteínas glicosiladas intactas han sido desarrolladas en la técnica, e incluyen las líneas de célula COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), CHO (por ejemplo, ATCC CRL 1610) y BCS-1 (por ejemplo ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8:653, SP2/0-Ag14, células 293, células HeLa y similares, las cuales son fácilmente disponibles de, por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Células huésped preferidas incluyen células de origen linfoide, tales como células mieloma y linfoma. Células huésped particularmente preferidas son

particularmente preferida, la células recombinante es una célula P3X63Ab8.653, ó una célula SP2/0-Ag14.

5 Vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de expresión, tales como, pero no están limitadas a un origen o réplica; un promotor (por ejemplo, promotores tardíos o tempranos de SV40, los promotores CMV (patentes estadounidenses Nos. 10 5.168.062, 5.385.839); un promotor de HSV tk, un promotor de pgk (cinasa de fosfoglicerato), un promotor EF-1 alfa (Patente Estadounidense No. 15 5.266.491), por lo menos un promotor de inmunoglobulina humana; un mejorador, y/o procesador de sitios de información, tales como sitios de ligazón de ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de poli A adición SV40 grande T Ag), y secuencias transcripcionales de terminador. Véanse, por ejemplo, Ausubel y 20 colaboradores; supra; Sambrook y colaboradores, supra. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención son conocidas y/o disponibles, por ejemplo, del American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) u otras fuentes comerciales conocidas.

20

Cuando son empleadas las células huésped eucarióticas, secuencias terminadoras de poliadenilación o transcripción son típicamente incorporadas dentro del vector. Un ejemplo de secuencias terminadoras es

pueden ser incluidas. Un ejemplo de una secuencia de empalme es el intro VP1 proveniente de SV40 (Sprague, y colaboradores, J. Virol. 45:773-781 (1983)). Adicionalmente, secuencias de genes para aplicación de control en la célula huésped pueden ser incorporadas dentro del vector, como se sabe

5 en la técnica.

Purificación de un anticuerpo

Una anticuerpo de integrin anti-dual puede ser recuperado y purificado desde cultivos de células recombinantes mediante métodos suficientemente

10 conocidos que incluyen, pero no están limitados a ello, purificación de proteína A, precipitación de sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio de anión o catión, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina.

15 Cromatografía de líquido de alto rendimiento ("HPLC") también puede ser empleada para purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10, cada uno incorporado aquí completamente por vía de referencia.

20

Anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos químicos sintéticos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes desde un huésped eucariótico,

por recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede ser glicosilado o puede ser no-glicosilado, prefiriéndose el glicosilado. Tales métodos son descritos en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Sambrook, supra, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, supra, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein Science, supra, Capítulos 12-14, todos incorporados aquí completamente por vía de referencia.

Anticuerpos Integrin Anti-duales

Los anticuerpos aislados de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácido de anticuerpo expuesta aquí codificada por cualesquier polinucleótido adecuado, o cualquier anticuerpo aislado o preparado. De preferencia, el anticuerpo humano o fragmento que liga antígeno una integrin dual humano y, por este medio neutraliza parcial o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo, o porción especificada o variante del mismo, que parcialmente o preferentemente neutraliza de manera sustancial por lo menos una actividad biológica de la menos una proteína o fragmento de integrin dual puede ligar la proteína o fragmento y por este medio inhibir actividades mediadas a través de la unión de integrin dual al receptor de integrin dual o a través de otros mecanismos dependientes o intervenidos de integrin dual. Tal como aquí se emplea, el término "Anticuerpo Neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de integrin dual en aproximadamente 20-120%, de preferencia al menos aproximadamente 10,

anti-dual para inhibir una actividad dependiente de un integrin dual es valorada de preferencia mediante al menos un ensayo adecuado de una proteína o receptor integrin dual adecuado, según se describe aquí y/o como es sabido en la técnica. Un anticuerpo humano de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena liviana kappa o lambda. En una modalidad, el anticuerpo humano comprende una cadena pesada de IgG o fragmento definido, por ejemplo, al menos uno de isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4. Anticuerpos de este tipo pueden ser preparados empleando un ratón transgénico y otro mamífero transgénico no humano que comprende por lo menos la cadena liviana humana (por ejemplo, IgG, IgA y IgM (por ejemplo, κ 1, κ 2, κ 3, κ 4) transgenes según aquí se describió y/o como se sabe en el arte. En otra modalidad, el anticuerpo humano de integrin dual anti-humano comprende una cadena pesada de IgG1 y de una cadena liviana de IgG1.

15

Por lo menos un anticuerpo de la invención une al menos un epítipo especificado específico a al menos una proteína integrin dual, subunidad, fragmento, porción o cualquier combinación de las mismas. El por lo menos un epítipo puede comprender al menos una región que une anticuerpos que comprende al menos una porción de dicha proteína, el cual epítipo está formado de preferencia de al menos una porción extracelular, soluble, hidrofílica, externa o citoplásmica de dicha proteína. El al menos un epítipo especificado puede comprender cualquier combinación de al menos una

20

Generalmente, el anticuerpo humano o fragmento que une antígeno de la presente invención comprenderá una región que une antígeno que comprende por lo menos una región humana complementaria determinante (CDR1, CDR2, y CDR3) o variante de al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región humana determinante de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) o variante de al menos una región variable de cadena liviana. Como un ejemplo no limitativo, el anticuerpo o porción que une antígeno o variante puede comprender por lo menos una de las cadenas pesadas CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, y/o una cadena liviana CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6. En una modalidad particular, el anticuerpo o fragmento que une antígeno puede tener una región que une antígeno que comprende por lo menos una porción de al menos una cadena pesada CDR (es decir, CDR1, CDR2, y/o CDR3) que tiene la secuencia de aminoácido del correspondiente CDRs 1, 2 y/o 3 (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3). En otra modalidad particular, el anticuerpo o porción o variante que une antígeno puede tener una región que une antígeno que comprende por lo menos una porción de al menos una CDR de cadena liviana (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de las CDRs 1, 2 y/o 3 correspondientes (por ejemplo, SEQ ID NOS: 4, 5 y/o 6). En una modalidad preferida, las tres cadenas pesadas CDRs y las tres cadenas livianas CDRs del anticuerpo o fragmento que une antígeno tienen la

SEQ 3
AC } SEQ 6

AC.
ESP.

?

Tales anticuerpos pueden ser preparados uniendo químicamente entre sí las diferentes porciones (por ejemplo, estructuras CDRs) del anticuerpo utilizando técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo utilizando

5 técnicas convencionales de tecnología recombinante de ADN o utilizando cualquier otro método adecuado.

El anticuerpo de integrin anti-dual puede comprender al menos uno de una región variable de cadena pesada o liviana que tiene una secuencia de

10 aminoácido definida. Por ejemplo, en una modalidad preferida, el anticuerpo de integrin anti-dual comprende al menos una de al menos una región variable de cadena pesada, que tiene opcionalmente la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 7 y/o al menos una región variable de cadena liviana, que tiene opcionalmente la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:

AC { H: SEQ 7
L: SEQ 8

15 8. Anticuerpos que se unen a integrin dual humano y que comprenden una región variable definida de cadena pesada o liviana pueden ser preparados utilizando métodos adecuados, tales como exhibición de fagos (Katsube, Y. y colaboradores, Int J Mol. Med, 1(5):863-868 (1998)) o métodos que emplean animales transgénicos, como es sabido en la técnica y/o como aquí

20 se describe. Por ejemplo un ratón transgénico, que comprende un transgen de cadena pesada de inmunoglobulina humana funcionalmente dispuesta y un transgen que comprende ADN proveniente de un lugar de cadena liviana de inmunoglobulina humana que puede sufrir arreglo funcional, puede ser

anticuerpos pueden ser aisladas e hibridomas u otras células que producen anticuerpos inmortalizados pueden ser preparadas como se describió aquí y/o como se sabe en el arte. Alternativamente, el anticuerpo, porción específica o variante puede ser expresado utilizando el ácido nucleico que codifica o una porción del mismo en una célula huésped adecuada.

La invención también se relaciona con anticuerpos, fragmentos que unen antígenos, cadenas de inmunoglobulina y aminoácidos que comprenden CDRs en una secuencia que es sustancialmente la misma tal como la secuencia de aminoácidos aquí descrita. De preferencia, tales anticuerpos o fragmentos que unen antígenos y anticuerpos que comprenden tales cadenas o CDRs pueden unir integrin dual humano con alta afinidad (por ejemplo, KD menos que o igual a aproximadamente 10^{-9} M). Secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales tales como las secuencias aquí descritas incluyen secuencias que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos, así como supresiones y/o inserciones de aminoácidos. Una sustitución conservadora de aminoácido se refiere al reemplazo de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofilicidad) que son similares a aquellas del primer aminoácido. Sustituciones conservadoras incluyen reemplazo de un aminoácido por otro con los grupos siguientes: lisina (K), arginina (R) y histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina(Q),

leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptofano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Códigos de Aminoácidos

5 Los aminoácidos que constituyen anticuerpos de integrin anti-dual de la presente invención son frecuentemente abreviados. Las designaciones de aminoácidos pueden ser indicadas designando el aminoácido por su código de letra sencilla, su código de tres letras, nombre o codón(es) de tres nucleótidos como es bien entendido en la técnica (véase Alberts, B. Y

10 colaboradores, Molecular Biology of the Cell, Tercera edición, Garland Publishing Inc., Nueva York, 1994):

Código de una sola letra	Código de tres letras	Nombre	Codon(es) de tres nucleótidos
A	Ala	Alanina	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Cisteína	UGC, UGU
D	Asp	Ácido Aspártico	GAC, GAU
E	Glu	Ácido Glutámico	GAA, GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC, UUU
G	Gly	Glicina	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Histidina	CAC, CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Lisina	AAA, AAG
L	Leu	Leucina	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Metionina	AUG
N	Asn	Asparagina	ACC, AAU
P	Pro	Prolina	CCA, CCC, CCG, CCU

95
96

R	Arg	Arginina	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Serina	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Treonina	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Valina	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Triptofano	UGG
Y	Tyr	Tirosina	UAC, UAU

Una anticuerpo de integrin anti-dual de la presente invención puede incluir una o más sustituciones de aminoácido, supresiones o adiciones, ya sea desde mutaciones naturales o manipulación humana, como aquí se especifica.

Naturalmente, el número de sustituciones de aminoácido un artesano experimentado lo haría depender de muchos factores, que incluyen los descritos anteriormente. Hablando en general, el número de sustituciones de aminoácido, inserciones o supresiones para cualquier anticuerpo anti-dual dado no será mas de 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tal como 1-30 o cualquier intervalo o valor aquí, tal como aquí se especifica.

Aminoácidos en un anticuerpo integrin anti-dual de la presente invención que son esenciales para función pueden ser identificados mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida

El último procedimiento introduce mutaciones de alanina sencilla en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes son entonces probadas para actividad biológica, tal como, pero no limitada a por lo menos una actividad neutralizante de integrin dual. Sitios que son críticos para
5 unión de anticuerpos también pueden ser identificados por análisis estructural tal como cristalización, resonancia magnética nuclear, o rotulación de fotoafinidad (Smith, y colaboradores, J. Mol. Biol., 224:899-904 (1992) y de Vos, y colaboradores, Science 255:306-312 (1992)).

10 Anticuerpos integrin anti-duales de la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, al menos una porción, secuencia o combinación seleccionada desde 5 hasta todos los aminoácidos contiguos de al menos uno de la SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6. ?

15 Un anticuerpo integrin anti-dual puede además opcionalmente comprender un polipéptido de al menos uno de 70-100% de los aminoácidos contiguos de por lo menos uno de SEQ ID NOS: 7,8.

20 En una modalidad, la secuencia de aminoácido de una cadena de inmunoglobulina, o preparación de la misma (por ejemplo, la región variable, CDR) tiene aproximadamente 70-100% de identidad (por ejemplo, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier intervalo de valores dentro de

de una región variable de cadena liviana puede ser comparada con la secuencia de SEQ ID NO:8, o la secuencia de aminoácido de cadena pesada CDR3 puede ser comparada con SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, identidad de aminoácido de 70-100% (es decir, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier intervalo o valor dentro del mismo) es determinado utilizando un algoritmo adecuado de computador, como se sabe en la técnica.

Cadena pesada ejemplificativa y secuencias de regiones variables de cadena liviana están provistas en SEQ ID NOS: 7,8. Los anticuerpos de la presente invención, o sus variante especificadas, pueden comprender cualquier número de residuos contiguos de aminoácido provenientes de un anticuerpo de la presente invención, en donde tal número se selecciona entre el grupo de números enteros que consisten desde 10-100% del número de residuos contiguos en un anticuerpo de integrin anti-dual. Opcionalmente, la secuencia de aminoácidos contiguos es al menos de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 o más aminoácidos de longitud o cualquier intervalo o valor en la misma. Adicionalmente, el número de tales secuencias puede ser cualquier número entero seleccionado entre el grupo formado por 1 a 20, tal como al menos 2, 3, 4, o 5.

Como aquellos de experiencia en la materia apreciarán, la presente

específica por lo menos de 20%, 30%, ó 40% , y de preferencia por lo menos de 50%, 60%, o 70%, y con mayor preferencia de por lo menos 80%, 90% o 95-100% de la de los anticuerpos nativos (no sintéticos), endógenos o relacionados y anticuerpo conocido. Los métodos de ensayar y de cuantificar
5 medidas de actividad enzimática y substratos específicamente, son bien conocidos para aquellos de experiencia en la materia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con anticuerpos humanos y fragmentos que ligan antígenos, según aquí se describe, los cuales son
10 modificados por la unión covalente de una porción orgánica. Tal modificación puede producir un anticuerpo o fragmento que liga antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, vida media de suero in vivo incrementada). La porción orgánica puede ser un grupo polimérico hidrofílico ramificado o lineal, un grupo ácido graso o un grupo de éster de ácido graso.
15 En modalidades particulares, el grupo polimérico hidrofílico puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 hasta cerca de 120000 Daltons y puede ser un polialquilén glicol (por ejemplo, polietilén glicol (PEG), polipropilén glicol (PPG)), polímero carbohidrato, polímero aminoácido o polivinil pirrolidona, y el ácido graso o el grupo éster de ácido graso puede
20 comprender desde cerca de 8 hasta alrededor de 40 átomos de carbono.

Los anticuerpos modificados y los fragmentos que unen antígeno de la invención pueden comprender una o más porciones orgánicas que están

antígeno de la invención puede ser independientemente un grupo polimérico hidrofílico, un grupo de ácido graso o un grupo de éster de ácido graso. Tal como aquí se usa, el término "ácido graso" abarca ácidos monocarboxílicos, y ácidos di-carboxílicos. Un "grupo polimérico hidrofílico", tal como el término

5 se utiliza aquí, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. De esta manera, un anticuerpo modificado por la unión covalente de polilisina está abarcada por la invención. Polímeros hidrofílicos adecuados para modificar anticuerpos de la invención pueden ser lineales o ramificados

10 e incluyen, por ejemplo, glicoles de polialcano (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietilén glicol (mPEG), PPG y similares), carbohidratos (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos, y similares), polímeros de aminoácidos hidrofílicos (por ejemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialquileno (por ejemplo, óxido de

15 polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinil pirrolidona. De preferencia, el polímero hidrofílico que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular de aproximadamente 800 hasta cerca de 150000 Daltons como una entidad molecular separada. Por ejemplo, PEG5000 y PEG20000, en donde el subíndice es el peso molecular promedio del

20 polímero en Daltons, puede ser utilizado. El grupo polimérico hidrofílico puede ser substituido con 1 hasta aproximadamente 6 grupos alquilo, ácido graso o grupos éster de ácido graso. Polímeros hidrofílicos que son substituidos con un ácido graso o grupo éster de ácido graso puede ser

graso o éster del ácido graso y un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonil diimidazol) o un ácido graso o éster de ácido graso puede ser acoplado a un grupo hidroxilo en un polímero.

5 Ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para anticuerpos modificantes de la invención pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de insaturación. Ácidos grasos que son adecuados para anticuerpos modificantes de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C12, laurato), n-tetradecanoato (C14, miristato), n-
10 octadecanoato (C18, estearato), n-eicosanoato (C20, araquidato), n-docosanoato (C22, behenato), n-triacontanoato (C30), n-tetracontanoato (C40), cis- Δ^9 -octadecanoato (C18, oleato), todo cis- $\Delta^5, 8, 11, 14$ -eicosatetraenoato (C20, araquidonato), ácido octanedióico, ácido tetradecanedióico, ácido octadecanedióico, ácido docosanedióico y
15 similares. Ésteres adecuados de ácido graso incluyen monoésteres de ácidos dicarboxílicos, que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender desde uno hasta aproximadamente doce de preferencia desde uno hasta aproximadamente seis átomos de carbono.

20

Los anticuerpos humanos modificados y los fragmentos unidos a antígeno pueden ser preparados utilizando métodos adecuados, tales como mediante reacción con uno o más agentes modificantes. Un "agente

éster de ácido graso) que comprende un grupo activador. Un "grupo activador" es una porción química o grupo funcional que puede, bajo condiciones apropiadas reaccionar con un segundo grupo químico formando por ese medio un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo

5 grupo químico. Por ejemplo, grupos activantes amino-reactivos incluyen grupos electrofílicos tales como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, fluor, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS), y similares. Grupos activadores que pueden reaccionar con tioles, incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, ácido tiol 5-tiol-2-

10 nitrobenzónico (TNB-tiol), y similares. Un grupo funcional aldehído puede ser acoplado a moléculas que contienen amino- ó hidrazido- y un grupo azida puede reaccionar con un grupo fosforoso trivalente para formar enlaces de fosforamidato o fosforimida. Métodos adecuados para introducir grupos activadores dentro de las moléculas son conocidos en la técnica (véase por

15 ejemplo, Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic press: San Diego, CA (1996)). Un grupo activador puede estar directamente unido al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrofílico, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de una porción ligadora, por ejemplo, un grupo divalente C1-C12 en donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados

20 por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Porciones ligadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, tetraetilén glicol, $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ y $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-NH-$. Agentes modificadores que comprenden una porción ligadora pueden ser

ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la primera amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede ser retirado del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que puede ser acoplada a otro carboxilato según se describió, o puede ser reaccionado con anhídrido maléico y el producto resultante ciclizado para producir un derivado activado de maleimido del ácido graso. (Véase, por ejemplo, Thompson y colaboradores, WO 92/16221 las enseñanzas completas de la cual son incorporadas aquí por vía de referencia).

Los anticuerpos modificados de la invención pueden ser producidos haciendo reaccionar un anticuerpo humano o antígeno-fragmento ligador con un agente modificante. Por ejemplo, las porciones orgánicas pueden ser unidas al anticuerpo en una manera de sitio no específico empleando un agente modificador amino-reactivo, por ejemplo, un éster NHS de PEG. Anticuerpos humanos modificados o fragmentos que unen antígenos también pueden ser preparados reduciendo enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro intra-cadena) de un anticuerpo o fragmento que une antígeno. El anticuerpo reducido o fragmento que une oxígeno puede hacerse reaccionar entonces con un agente modificante reactivo de tiol para producir el anticuerpo modificado de la invención. Anticuerpos humanos modificados y fragmentos que unen antígeno que comprenden una porción

de proteólisis inversa (Fisch y colaboradores, *Bioconjugate Chem.* 3:147-153 (1992); Werlen y colaboradores, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran y colaboradores, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh y colaboradores, *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68 (1996); Capellas y
5 colaboradores, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), y los métodos descritos en Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO PARA COMPOSICIONES DE 10 ANTICUERPO DE INTEGRIN ANTI-DUAL

Además de anticuerpos integrin monoclonales o quiméricos anti-duales, la presente invención también está dirigida a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para tales anticuerpos de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos en
15 general asociados con la región que liga antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede ser preparado inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como la fuente del anticuerpo Id con el anticuerpo o una región de la misma que contiene CDR. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del
20 anticuerpo inmunizante y producen un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id puede también ser utilizado como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune todavía en otro animal, produciendo un así llamado anticuerpo anti-anti-Id.

COMPOSICIONES DE ANTICUERPO INTEGRIN ANTI-DUAL

La presente invención provee también al menos una composición de anticuerpo integrin anti-dual que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o más anticuerpos integrin anti-dual de los mismos, según aquí se describe y/o se sabe en la técnica que son provistos en una composición, mezcla o forma que ocurre de manera no natural. Tales composiciones comprende composiciones que ocurren de manera no natural, que comprenden por lo menos una o dos variantes de C- y/o N- terminalmente suprimidas de longitud completa, de dominios, fragmentos, o variantes específicas, de la secuencia de anticuerpo de aminoácidos integrin anti-dual seleccionada entre el grupo formado por 70-100% de los aminoácidos contiguos de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o fragmentos especificados, dominios o variantes especificadas de los mismos. Composiciones preferidas de anticuerpos de integrin anti-dual incluyen por lo menos uno o dos fragmentos, dominios o variantes de longitud completa como de al menos un CDR o LBR que contienen porciones de la secuencia de anticuerpos integrin anti-duales de 70-100% de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó fragmentos, dominios o variantes especificadas de los mismos. Composiciones adicionalmente preferidas comprende 40-99% de al menos uno de 70-100% de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó fragmentos, dominios, variantes especificados de los mismos. Tales porcentajes de composición se dan en peso, volumen, concentración, molaridad, o molalidad como soluciones

Composiciones de anticuerpo integrin anti-duales de la presente invención pueden comprender adicionalmente por lo menos una de cualquier cantidad adecuada y efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual o una célula, tejido, órgano, animal o paciente en necesidad de tal modulación, tratamiento o terapia opcionalmente además comprendiendo al menos una forma seleccionada de la menos un antagonista TNF (por ejemplo, pero limitada a un anticuerpo o fragmento de TNF, un receptor o fragmento soluble de TNF, proteínas de fusión del mismo, o una pequeña molécula de antagonista de TNF), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofin, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de oro y sodio, sulfato de hidroxycloroquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobial (por ejemplo aminoglucósido, un antihongos, un antiparasítico, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, una macrolida, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobial), un antipsoriático, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un nutricional, un agente de tiroides, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiúlceras, un laxante, un anticoagulante, una eritropoietina (por ejemplo, epoetin alfa), un

- ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, una droga de reemplazo de hormona, un modulador de receptor de estrógeno, un midriático, un cicloplégico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo,
- 5 un agente antimánico, un antipsicótico, un anxiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicación para asma, un beta agonista, una esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, domasa alfa, (pulmozyme), una citoquina o un antagonista o anticuerpo de citoquina.
- 10 Ejemplos no limitativos de tales citosinas incluyen, pero no están limitados a estos, cualesquiera de los anticuerpos anti-tumorales IL-1 a IL-23, IL-6, agentes terapéuticos o terapias de radiación. Dosificaciones adecuadas son bien conocidas en el arte. Véanse, por ejemplo, Well, y colaboradores, eds., Pharmacotherapy Handbook, 2da edición, Appleton y Lange, Stamford, CT
- 15 (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Edición De Lujo, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), cada una de tales referencias es completamente incorporada aquí por vía de referencia.

- Tales anti-cáncer o anti-infecciosos también pueden incluir moléculas
- 20 de toxina que son asociadas, ligadas, co-formuladas o co-administradas con al menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina opcionalmente puede actuar para matar selectivamente células o tejidos patológicos. La célula patológica puede ser un cáncer u otra célula. Tales toxinas pueden

funcional, por ejemplo, seleccionado entre al menos uno de ricin, toxina de difteria, una toxina de veneno, o una toxina bacterial. El término toxina incluye también tanto endotoxinas como exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus mutante o recombinante, que ocurra naturalmente, o virus

5 que puedan causar cualesquier condición patológica en humanos y otros animales, incluyendo choque de toxinas, el cual puede originar la muerte. Tales toxinas pueden incluir, pero no están limitadas a esto, E.Coli enterotoxigénico enterotoxina lábil al calor (LT), enterotoxina estable al calor (ST), citotoxina Shigella, enterotoxinas Aeromonas, toxina-1 de síndrome de

10 choque tóxico (TSST-1), enterotoxina A estafilococa (SEA), B (SEB), o C (SEC), enterotoxinas estreptococales y similares. Tales bacterias incluyen, pero no están limitadas a esto, cepas de una especie de E.Coli (ETEC), enterooxigénico, E.Coli enterohemorrágico (por ejemplo, especies de serotipo O157:H7), especies de estafilococos (por ejemplo, Staphylococcus

15 aureus, Staphylococcus pyogenes), especies Shigella (por ejemplo, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii, y Shigella sonnei), especies de Salmonella (por ejemplo, Salmonella typhi, Salmonella cholera-suis, Salmonella enteritidis), especies de Clostridium (por ejemplo, Clostridium perfringens, Clostridium difficile, Clostridium botulinum), especies

20 Campylobacter (por ejemplo, Campylobacter jejuni, Campylobacter fetus), especies Helicobacter (por ejemplo, helicobacter pylori), especies Aeromonas (por ejemplo, Aeromonas sobria, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae), Pleisomonas shigelloides, Yersinia enterocolitica, especies Vibrios (por

INTERNAL MEDICINE, 3ra edición, pp 1-13, Little, Brown y Co., Boston (1990); Evans y colaboradores, eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2da edición, pp 239-254, Plenum Medical Book Co., Nueva York (1991); Mandell y colaboradores, principles and Practice of
5 infectious Diseases, 3ra edición, Churchill Livingstone, Nueva York (1990); Berkow y colaboradores, eds., The Merck Manual, 16va edición, Merck & Co., Rahway, N.J., 1992; Wood y colaboradores, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); marrack y colaboradores, Science, 248:705-711 (1990), los contenidos de las cuales son incorporados aquí
10 completamente por vía de referencia.

Compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpos integrin anti-dual de la presente invención pueden comprender adicionalmente por lo menos uno de cualquier auxiliar adecuado, tales como, pero no limitados a,
15 diluyente, aglutinante, estabilizador, buffers, sales, solventes lipofílicos, preservativos, adyuvante y similares. Se prefieren auxiliares farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitativos de, y métodos de preparar tales soluciones estériles son bien conocidos en la técnica, tales como pero no limitados a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical
20 Sciencies, 18va edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser seleccionados de manera rutinaria que son adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad del anticuerpo, fragmento, o composición variante de integrin

Excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, que incluyen monosacáridos, di-, tri-, y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como albitoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), los cuales pueden estar presentes individualmente o en combinación, que comprenden solos o en combinación 1-99,99% en peso o en volumen. Excipientes de proteínas ejemplificativos incluyen albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Aminoácido/ anticuerpo componentes representativo que puede también funcionar en una capacidad amortiguadora, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cistina, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. Un aminoácido preferido es glicina.

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

Composiciones de anticuerpo integrin anti-dual pueden incluir también un buffer o un agente regulador de pH; típicamente, el buffer es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánica. Buffers representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido
5 ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico; tris, hidrocloreuro de trometamina, o buffers de fosfato. Buffers preferidos para uso en las presentes composiciones son sales de ácido orgánico tales como citrato.

10 Adicionalmente, composiciones de anticuerpos integrin anti-dual de la invención pueden incluir excipientes / aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficales (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), polietilén glicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobiales, endulzantes, antioxidantes,
15 agentes antistáticos, surfactantes (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

20 Estos y adicionales excipientes farmacéuticos conocidos y/o aditivos adecuados para uso en el anticuerpo de integrin anti-dual, composiciones anteriores o variantes de acuerdo con la invención son conocidas en la técnica, por ejemplo, según se consignan en lista en "Remington: The

Montvale, NJ (1998), las exposiciones de las cuales son incorporadas directamente aquí por vía de referencia. Materiales portadores o excipiente preferidos son carbohidratos (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y buffers (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

5

Formulaciones

Como se hizo notar anteriormente, la invención provee formulaciones estables, la cual de preferencia es un buffer de fosfato con solución salina o una sal seleccionada, así como también soluciones preservadas y

10 formulaciones que contienen un preservativo así como también formulaciones preservadas de uso múltiple adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual en una formulación farmacéuticamente aceptable. Formulaciones conservadas contienen por lo menos un preservativo

15 conocido u opcionalmente seleccionado entre el grupo formado por al menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metil, etil, propil, butil y radicales similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de

20 sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Cualquier concentración o mezcla adecuada puede ser útil según se conoce en la técnica, tal como 0,001-5% o cualquier rango o valor dentro del mismo, tal como, pero no limitado a 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03,

3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, o cualquier intervalo o valor dentro del mismo. Ejemplos no limitativos incluyen, no preservativo, 0,1-2% de m-cresol (por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% de alcohol bencílico (por ejemplo, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0%),
5 0,001-0,5% de timerosal (por ejemplo 0,005, 0,01), 0,001-2,0% de fenol (por ejemplo, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% de alquilparabenos (por ejemplo, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%), y similares.

10 Como se hizo notar anteriormente, la invención provee un artículo de manufactura, que comprende material de empaque y al menos una botellita que contiene una solución de al menos un anticuerpo de integrin anti-dual con los buffers prescritos y/o preservativos opcionalmente en un diluyente acuoso, en donde dicho material de empaque comprende una etiqueta que
15 indica que tal solución puede ser mantenida durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o mayor. La invención comprende adicionalmente un artículo de manufactura que comprende material de empaque, una primera botellita que comprende liofilizado al menos un anticuerpo integrin anti-dual, y una segunda botellita
20 que comprende un diluyente acuoso del buffer prescrito o preservativo, en donde dicho material de empaque comprende una etiqueta que instruye a un paciente a reconstituir el al menos un anticuerpo integrin anti-dual en el diluyente acuoso para formar una solución que puede ser mantenida durante

El al menos un anticuerpo anti-dual utilizado en conformidad con la presente invención puede ser producido mediante medios recombinantes, que incluyen desde células de mamíferos o preparaciones transgénicas, o pueden ser purificadas desde otras fuentes biológicas, como aquí se describió o como se sabe en la técnica. El intervalo de al menos un anticuerpo integrin anti-dual en el producto de la presente invención incluye cantidades que producen a la reconstrucción si es en un sistema húmedo/seco, concentraciones de aproximadamente 1,0 μ g/ml hasta aproximadamente 1000 mg/ml, aunque concentraciones más bajas y más elevadas son operables y son dependientes del vehículo de suministro que se tiene en mente, por ejemplo, formulaciones de solución diferirán de parche transdérmico, pulmonar, transmucosal, o métodos osmóticos o de microbomba.

De preferencia, el diluyente acuoso opcionalmente comprende además un preservativo farmacéuticamente aceptable. Preservativos preferidos incluyen aquellos seleccionados entre el grupo formado por fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencilico, alquilparabeno (metil, etil, propil, butil, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal, o sus mezclas. La concentración de preservativo utilizado en la formulación es una concentración suficiente para producir un efecto anti-microbial. Tales concentraciones son dependientes de los preservativos seleccionados y son

Otros excipientes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, buffers, antioxidantes, mejoradores preservativos, pueden opcionalmente, y de preferencia ser agregados al diluyente. Un agente de isotonicidad, tal como glicerina, es comúnmente usado a concentraciones conocidas. Un buffer fisiológicamente tolerado es de preferencia agregado para proveer control de pH mejorado. Las formulaciones pueden cubrir un amplio intervalo de pHs, tal como desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 10, e intervalos preferidos desde aproximadamente pH 5 hasta aproximadamente pH 9, y un intervalo más preferido de aproximadamente 6,6 hasta alrededor de 8,0. De preferencia, las formulaciones de la presente invención tienen pH entre aproximadamente 6,8 y alrededor de 7,8. Buffers preferidos incluyen buffers de fosfato, más preferentemente fosfato de sodio, particularmente fosfato convertido en buffer salino (PBS).

Otros aditivos, tales como solubilizadores farmacéuticamente aceptables como Tween 20 (polioxietilene (20) monolaurato de sorbitán), Tween 40 (polioxietilén (20) de monopalmitato de sorbitán), Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), Pluronic F68 (copolímeros de bloque de polioxietileno polioxipropileno), y PEG (polietilén glicol) o surfactantes no-iónicos tales como polisorbato 20 u 80, o poloxamer 184 o 188, polilos de Pluronic®, otros copolímeros de bloque y queladores tales como EDTA y EGTA opcionalmente pueden ser añadidos a las formulaciones o composiciones para reducir agregación. Estos aditivos son

de superficie farmacéuticamente aceptable mitiga la propensidad de la proteína para agregarse.

Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse
5 mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo
integrin anti-dual y un preservativo seleccionado entre el grupo formado por
fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico,
alquilparabeno, (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio,
cloruro de bencetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los
10 mismos en un diluyente acuoso. La operación de mezcla el al menos un
anticuerpo integrin anti-dual y preservativo en un diluyente acuoso es llevada
a cabo utilizando disolución convencional y procedimientos de mezcla. Para
preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de
por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual en solución hecha buffer es
15 combinado con el preservativo deseado en una solución convertida en buffer
en cantidades suficientes para proveer la proteína y el preservativo en las
concentraciones deseadas. Variaciones de este proceso serían reconocidas
por alguien de experiencia ordinaria en la materia. Por ejemplo, el orden en
que los componentes son agregados, en caso de que se usen aditivos
20 adicionales, la temperatura y el pH a los cuales la formulación es preparada,
son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y
medios de administración utilizados.

anticuerpo integrin anti-dual por lo menos liofilizado que es reconstituido con una segunda botellita que contiene agua, un preservativo y/o excipientes, de preferencia un buffer de fosfato y/o salina y una sal seleccionada, en un diluyente acuoso. Ya sea una botellita de solución sencilla, o una botellita dual que requiere reconstitución puede ser utilizada repetidamente en múltiples ocasiones y puede ser suficiente para un solo ciclo o para múltiples ciclos de tratamiento de paciente y de esta manera puede proveer un régimen de tratamiento más conveniente que el actualmente disponible.

10 Los presentes artículos de manufactura reivindicados son útiles para administración durante un periodo de inmediatamente hasta 24 horas o mayor. En consecuencia, los artículos de manufactura actualmente reivindicados ofrecen ventajas significativas al paciente. Formulaciones de la invención opcionalmente pueden ser almacenadas con seguridad a 15 temperaturas desde aproximadamente 2 hasta alrededor de 40°C y retienen la actividad biológica de la proteína durante periodos prolongados de tiempo, de esta manera, permitiendo una etiqueta de empaque indique que la solución puede ser mantenida y/o utilizada durante un periodo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, o 96 horas o mayor. Si el diluyente preservado es utilizado, tal 20 etiqueta puede incluir uso hasta de 1-12 meses, la mitad, uno y medio, y/o dos años.

Las soluciones de al menos un anticuerpo integrin anti-dual en la

mezcla es llevada a cabo utilizando dilución y procedimientos de mezcla convencionales. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, una cantidad medida de al menos anticuerpo en agua o buffer es combinada en cantidades suficientes para proveer la proteína y opcionalmente un preservativo o buffer a las concentraciones deseadas. Variaciones de este proceso serían reconocidas por alguien de experiencia ordinaria en la materia. Por ejemplo, el orden en que los componentes son agregados, si aditivos adicionales son utilizados, la temperatura y el pH al cual la formulación es preparada, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y medios de administración utilizados.

Los procedimientos reivindicados pueden ser provistos a pacientes como soluciones claras o como botellitas duales que comprenden una botellita de liofilizado al menos un anticuerpo integrin anti-dual que es reconstituido con una segunda botellita que contiene el diluyente acuoso. Ya sea una sola botellita de solución o botellita dual que requiera reconstitución puede ser utilizada múltiples veces y puede ser suficiente para un solo ciclo o para ciclos múltiples de tratamiento del paciente y de esta manera provee un régimen de tratamiento más conveniente que el actualmente disponible.

20

El producto reivindicado puede ser provisto indirectamente a pacientes suministrando a farmacias, clínicas, u otras de tales instituciones y facilidades, soluciones claras o botellitas duales que comprenden una

solución clara en este caso puede ser hasta un litro o aún más grande en tamaño, proporcionando un depósito grande desde el cual porciones más pequeñas de la al menos una solución de anticuerpo puede ser recuperada una o múltiples veces para transferir dentro de botellitas más pequeñas y
 5 provistas por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

Dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de botellita sencilla incluyen aquellos dispositivos de depósito inyector para suministro de una solución tal como BD pens, BD Autojector®, Humaject®, Novopen ,
 10 B-D®Pen, AutoPen®, y OptiPen®, GenotropinPen ®, Genotronorm Pen , HumatroPen ®, Reco-Pen®, Roferon Pen ®, Biojector ®, iject®, J-tip needle free Injector ®, Intraject ®, Medi-Ject®, por ejemplo, según se hacen o se desarrollaron por Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Suiza,
 15 www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston medical (peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com).
 Dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de botellita dual incluyen aquellos sistemas de depósito inyector para reconstituir una droga
 20 liofilizada en un cartucho para suministro de la solución reconstituida tal como la HumatroPen®.

Los productos actualmente reivindicados incluyen material de

puede ser utilizado el producto. El material de empaque de la presente invención proporciona instrucciones al paciente para reconstituir en al menos un anticuerpo integrin anti-dual en el diluyente acuoso para formar una solución y para usar la solución durante un período de 2-24 horas o mayor

5 para el producto de dos botellitas, húmedo/seco. Para la botellita sencilla, el producto de solución, la etiqueta indica que tal solución puede ser utilizada durante un período de 2-24 horas o mayor. Los productos actualmente reivindicados son útiles para uso de productos farmacéuticos humanos. Las formulaciones de la presente invención pueden ser preparadas mediante un

10 proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo integrin anti-dual y un buffer seleccionado, de preferencia un buffer de fosfato que contenga solución salina o una sal seleccionada. La operación de mezcla de al menos un anticuerpo y un buffer es un diluyente acuoso es llevada a cabo utilizando procedimientos convencionales de disolución y de mezcla. Para preparar

15 una formulación adecuada, una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o buffer es combinada con el agente formador de buffer deseado en agua en cantidades suficientes para proveer la proteína y el buffer a las concentraciones deseadas. Variaciones de este proceso serían reconocidas por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, el orden

20 en que los componentes son agregados, si se utilizan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los cuales se prepara la formulación, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y medios de administración utilizados.

Las formulaciones estables o preservadas reivindicadas pueden ser provistas a pacientes como soluciones claras o como botellitas duales que comprenden una botellita de al menos anticuerpo integrin anti-dual liofilizado que es reconstituido con una segunda botellita que contenga un preservativo o buffer y excipientes en un diluyente acuoso. Ya sea una sola botellita de solución, o una botellita dual que requiere reconstitución puede ser reutilizada múltiples veces y puede ser suficiente para un solo ciclo o para ciclos múltiples de tratamiento de pacientes y de esta manera proporciona un régimen de tratamiento más conveniente que lo que se encuentra actualmente disponible.

Al menos un anticuerpo integrin anti-dual en ya sea las formulaciones o soluciones estables o preservadas aquí descritas, pueden ser administradas a un paciente de acuerdo con la presente invención por vía de una variedad de métodos de suministro que incluyen inyección SC o IM; o vía medios transdérmicos, pulmonares, transmucosales, de implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba, u otros medios apreciados por el artesano de experiencia, como son bien conocidos en el arte.

20 Aplicaciones terapéuticas

La presente invención también provee un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con integrin dual, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente, según se conoce en el oficio o según aquí

La presente invención también suministra un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con integrin dual, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye pero no está limitado a, al menos una enfermedad de obesidad, una enfermedad relacionada con el sistema inmune, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad maligna o una enfermedad neurológica.

La presente invención provee también un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con el sistema inmune, en una célula, tejido, órgano, animal, o que incluye el paciente, pero no está limitada a, al menos una artritis reumatoide, artritis juvenil reumatoide, artritis reumatoide juvenil de ataque sistémico, artritis soriática, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, eritematosis sistémica de lupus, síndrome antifosfolípido, neuritis iridocilitis/uveitis/óptica, fibrosis pulmonar idiopática, granulomatosis sistémica vasculitis/wegener, sarcoidosis, procedimientos de orquitis/vasectomía inversos, enfermedades alérgicas/ópticas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis de contacto alérgico, conjuntivitis alérgica, neumonitis de hipersensitividad, trasplantes, rechazo de órgano de trasplante, enfermedad de injerto-contrahuésped, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis gram positiva, sepsis gram

radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de angustia respiratoria de adultos, artritis reumatoide, hepatitis inducida por alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia de célula falciforme, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones de

5 hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenial, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafalaxis sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de transplante de riñón, rechazo de transplante de corazón, rechazo de transplante de hígado, rechazo de

10 transplante de páncreas, rechazo de transplante de pulmones, rechazo de transplante de médula ósea (BMT), rechazo de aloinjerto de piel, rechazo de transplante de cartílago, rechazo de injerto de huesos, rechazo de transplante de intestinos delgados, rechazo de implante de timo cerebral, rechazo de transplante de paratiroides, rechazo de xenoinjerto de cualquier

15 órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad anti-receptora, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes tipo B resistente a la insulina, asma, miastenia gravis, citotoxicidad por medio de anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia,

20 endocrinopatía, gamopatía monoclonal, y síndrome de cambios de piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal, síndrome de cambios de piel, síndrome de antifosfolípidos, pemfigus, escleroma, enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad idiopática de

dermatitis de contacto, neumonitis de hipersensibilidad, rechazo de
aloinjerto, granulomas debidos a organismos intracelulares, sensibilidad a
las drogas, metabólico/idiopático, enfermedad de Wilson, hemacromatosis,
deficiencia de alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de
5 Hashimoto, osteoporosis, evaluación de eje hipotalámico-pituitario-adrenal,
cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomielites, cachexia, fibrosis cística,
enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva
crónica (COPD), linfocitosis, hemofagocítica familiar, condiciones
dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis
10 glomerular, falla renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, terapia de
preeclampsia. okt3, terapia anti-cd3, terapia de citoquina, quimioterapia,
terapia de radiación (por ejemplo, incluye pero no está limitada a toxiemia,
anemia, cachexia, y similares), intoxicación crónica de salicilato y similares.
Véase, por ejemplo, el Merck Manual, 12va-17va edición, Merck & Company,
15 Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook,
Wells y colaboradores, eds., segunda edición, Appleton y Lange, Stamford,
Conn. (1998,2000), cada una incorporada enteramente por vía de referencia.

La presente invención provee también un método para modular o
20 tratar al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano,
animal, o paciente, que incluye, pero no está limitado a al menos uno de
síndrome de impacto cardíaco, infartación miocárdial, falla congestiva del
corazón, apoplejía, apoplejía isquémica, hemorragia, arterioesclerosis,

choque, sífilis del sistema cardiovascular, falla del corazón, cor pulmonale, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos ectópicos atriales, palpitación atrial, fibrilación atrial (sostenida o paroxismal), síndrome de post perfusión, respuesta de inflamación de desvío cardiopulmonar,

5 taquicardia atrial caótica o multifocal, taquicardia regular estrecha QRS, arritmia específica, fibrilación ventricular, arritmias de haz de His, bloqueo atrioventricular, bloqueo de haz de rama, desórdenes isquémicos miocárdiales, enfermedad de arteria coronaria, angina de pecho, infartación miocárdial, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada,

10 cardiomiopatía restrictiva, enfermedades valvulares del corazón, endocarditis, enfermedad pericardial, tumores cardíacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, desórdenes periféricos vasculares, desórdenes oclusivos arteriales, enfermedad arteriosclerótica periférica,

15 tromboangitis obliterans, desórdenes funcionales arteriales periféricos, fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedad venosa, trombosis venosa, venas varicosas, fístula arteriovenosa, linfedema, lipedema, angina inestable, injuria de reperfusión, síndrome de post bombeo, daño de isquemia-perfusión y enfermedades

20 similares. Tal método opcionalmente puede comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia.

La presente invención proporciona también un método para modular o tratar al menos una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye, pero no está limitada a por lo menos una de infección bacterial aguda o crónica, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, que incluyen infecciones bacteriales, y fúngicas, infección de VIH/ neuropatía de VIH, meningitis, hepatitis (A, B, o C, o una similar), artritis séptica, peritonitis, neurmonía, epiglottitis, e.coli 0157:h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, malaria, fiebre hemorrágica de dengue, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptococal, gangrena de gas, tuberculosis micobacteriana, micobacterium avium intracelular, neumonía de neumocistis carinii, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionella, enfermedad de lyme, influenza a, virus de epstein-barr, síndrome hemafagocítico vital asociado, meningitis vital encefalitis/aséptica, y enfermedades similares.

15

La presente invención también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero que no está limitado a, al menos una de: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), célula B, célula T, ó Fab ALL, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de célula pilosa, síndrome mielodiplástico (MDS), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma de No-Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma

20

paraneoplástico de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastática, cáncer relacionado con resorción de huesos, cáncer relacionado con dolor de huesos y enfermedades similares.

5

La presente invención también provee un método para modular o tratar al menos una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero no está limitado a, al menos una de: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, dolor de cabeza de migraña, demencia compleja por SIDA, enfermedades demielinantes, tales como esclerosis múltiple, y mielitis transversa aguda; desórdenes extrapiramidales y cerebelares tales como lesiones del sistema corticoespinal; desórdenes de los ganglios basales o desórdenes cerebrales; desórdenes de movimiento hipercinético, tales como Corea de Huntington y mal de sanvito; desórdenes de movimiento inducido por droga, tales como aquellos inducidos por drogas que bloquean receptores de dopamina de CNS; desórdenes de movimiento hipocinético, tales como enfermedad de Parkinson; Palsy supranúcleo progresivo; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebrales, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedriech, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de sistema múltiples (Mencel, dejerine.Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph); desórdenes sistémicos (emfermedad de refsum, abetalipoproteemia, ataxia, telangiectasia, y desorden de multi.sistema mitocondrial); desórdenes

10

15

20

neurogénicas (degeneración de células de cuerno anterior, tales como esclerosis aminotrófica lateral, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; síndrome de Down en edad media; enfermedad de cuerpo difuso de Lewy; demencia senil del tipo de cuerpo de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerótica sunaguda, enfermedad de Hallerorden-Spatz; y demencia pugilística, y enfermedades similares. Tal método opcionalmente puede comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo TNF o porción o variante especificada a una célula, tejido, órgano, animal o paciente en necesidad de tal modulación, tratamiento o terapia. Véase, por ejemplo, el Merck Manual, 16va edición, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

15 Cualquier método de la presente invención puede comprender administrar una cantidad efectiva de un compuesto o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo integrin anti-dual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente en necesidad de tal modulación, tratamiento o terapia. Tal método puede opcionalmente comprender
20 adicionalmente terapia de co-administración o combinación para tratar tales enfermedades inmunes, en donde la administración de dicho por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual, porción especificada o variante del mismo, comprende adicionalmente administrar, antes concurrentemente, y/o

fragmento, un receptor o fragmento soluble de TNF, proteínas de fusión del mismo, o una pequeña molécula de antagonista de TNF), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de oro sodio, sulfato de hidroxyclorequina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante de músculos, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anetético local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobial (por ejemplo, aminoglucósido, un antihongos, un antiparasítico, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, una macrolida, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobial, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un agente mineral, nutricional, tiroidal, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un anti-hemético, un anti-úlceras, un laxante, un anti coagulante, una eritropoietina (por ejemplo, alfa epoetina), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), una sargramostina (GM-CSF, Leuquina), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresivo (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, una droga de reemplazo de hormonas, un modulador receptor estrógeno, un midriático, un ciclopléxico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un agente antimánico, un anti-psicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicina de asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un

citoquina. Dosificaciones adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells y colaboradores, eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2da edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarason Pocket Pharmacopoeia 2000, Edición de lujo, 5 Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), cada una de tales referencias está completamente aquí incorporada por vía de referencia.

Antagonistas TNF adecuados para composiciones, terapia de combinación, co-administración, dispositivos y/o métodos de la presente
10 Invención (que comprenden adicionalmente por lo menos un anticuerpo, porción especificada y su variante, de la presente invención) incluyen pero no están limitados a, anticuerpos anti-TNF, sus fragmentos antígeno-
ligantes, y moléculas receptoras que se unen específicamente a TNF; compuestos que evitan y/o inhiben la síntesis de TNF, liberación de TNF o
15 su acción sobre células objetivo, tales como talidomida, tenidap, inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas receptores de adenosina A2b y mejoradores de receptores de adenosina A2b; compuestos que previenen y/o inhiben señalización de receptores TNF, tales como proteína activada con mitógeno (MAP) inhibidores de quinasa;
20 compuestos que bloquean y/o inhiben división TNF de membrana, tales como inhibidores de metaloproteinasa; compuestos que bloquean y/o inhiben actividad de TNF, tales como inhibidores de (ACE) enzima que convierte angiotensina (por ejemplo, captopril); y compuestos que bloquean

Tal como aquí se usa, un "anticuerpo de factor de necrosis de tumor", "anticuerpo de TNF", "anticuerpo TNF α ", o fragmento y similares disminuye, bloquea, inhibe, abroga o interfiere con la actividad de TNF α in vitro, in situ y/o de preferencia in vivo. Por ejemplo, un anticuerpo humano de TNF

5 adecuado de la presente invención pueden unir TNF α e incluyen anticuerpos anti- TNF, fragmentos que ligan antígeno de los mismos, y cantidades especificadas de dominios de los mismos que se ligan específicamente a TNF α . Un anticuerpo o fragmento adecuado de TNF también puede disminuir bloqueo, abrogar, interferir, evitar y/o inhibir TNF ARN, ADN o

10 síntesis de proteína, desprendimiento de TNF, señalización de receptor de TNF, división de membrana de TNF, actividad de TNF, producción y/o síntesis de TNF.

Anticuerpo quimérico cA2 formado por el antígeno que une la región

15 variable del anticuerpo TNF α IgG1 anti humano de ratón neutralizante de alta afinidad, designado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina kappa, humana IgG1. La región humana IgG1 mejora la función de factor de anticuerpo halogénico, aumenta la vida media de suero circulante y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y

20 especificidad epítipo del anticuerpo quimérico cA2 es derivada de la región variable del anticuerpo de murina A2. En una modalidad particular, una fuente preferida para ácidos nucleicos que codifiquen la región variable del anticuerpo A2 de murina es la línea celular de hibridoma A2.

El anticuerpo quimérico A2 (cA2) neutraliza el efecto citotóxico de TNF α tanto natural como humano recombinante en una manera dependiente de la dosis. A partir de ensayos de ligazón de anticuerpo quimérico cA2, y TNF α humana recombinante, la afinidad constante del anticuerpo quimérico cA2 fue calculada para ser $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Métodos preferidos para determinar anticuerpos monoclonales de especificidad y afinidad mediante inhibición competitiva pueden ser encontrados en Harlow y colaboradores, *Antibodies; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Colligan y colaboradores eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, Nueva York, (1992-2000); Kozbor y colaboradores, *immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel y colaboradores eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York (1987-2000); y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983), referencias las cuales se incorporan aquí completamente por vía de referencia.

En una modalidad particular, el anticuerpo A2 de murina monoclonal es producido por una línea celular designada c134A. El anticuerpo quimérico cA2 es producido por una línea designada c168A.

20

Ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales anti-TNF que pueden ser utilizados en la presente invención son descritos en el arte (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.231.024; Möller, A, y

colaboradores, Publicación Internacional No. WO 91/02078 (publicada en febrero 21 de 1991); Rubin y colaboradores, EPO Publicación de Patente No. 0218 868 (publicada el 22 de abril de 1978); Yone y colaboradores, EPO Publicación de Patente No. 0 288 088 (Octubre 26, 1988); Liang y
5 colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137:847-854 (1986); Meager, y colaboradores, Hybridoma 6:305-311 (1987); Fendly y colaboradores, Hybridoma 6:359-369 (1987); Bringman, y colaboradores, Hybridoma 6:489-507 (1987); y Hirai y colaboradores, J. Immunol. Meth. 96:57-62 (1987), referencias las cuales se incorporan aquí enteramente por
10 vía de referencia.

Moléculas receptoras de TNF

Moléculas receptoras preferidas de TNF útiles en la presente invención son aquellas que unen $\text{TNF}\alpha$ con alta afinidad (véase, por
15 ejemplo, Feldmann y colaboradores, Publicación Internacional No. WO 92/07076 (publicada el 30 de abril de 1992); Schall y colaboradores, Cell 61:361-370 (1990); y Loetscher y colaboradores, Cell 61:351-359 (1990), referencias estas que son enteramente incorporadas aquí por vía de referencia) y opcionalmente poseen baja inmunogenicidad. En particular, los
20 receptores superficiales de células, 55 kDa (p55 TNF-R) y de 75 kDa (p75 TNF-R) TNF son útiles en la presente invención. Formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares (ECD) de los receptores o sus porciones funcionales (véase, por ejemplo, Corcoran y

comprenden el ECD, han sido detectadas en la orina y el suero como proteínas inhibitorias que unen 30 kDa y 40 kDa TNF α (Engelmann, H. y colaboradores, J. Biol. Chem. 265:1531-1536 (1990)). Moléculas multiméricas receptoras de TNF y moléculas de fusion inmunoreceptoras TNF, y derivados y fragmentos o porciones de las mismas, son ejemplos adicionales de moléculas receptoras de TNF las cuales son útiles en los métodos y composiciones de la presente invención. Las moléculas receptoras TNF que pueden ser utilizadas en la invención se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante períodos prolongados con alivio de síntomas bueno a excelente y baja toxicidad. Baja inmunogenicidad y/o alta afinidad, así como también otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos logrados.

Las moléculas multiméricas receptoras TNF útiles en la presente invención comprenden todas o una porción funcional de los ECD de dos o más receptores de TNF ligados a través de uno o más ligadores polipéptidos o de otros ligadores no polipéptidos tales como polietilenglicol (PEG). Las moléculas multiméricas adicionalmente pueden comprender un solo péptido de una proteína secretada para expresión directa de la molécula multimérica. Estas moléculas multiméricas y métodos para su producción han sido descritas en la solicitud estadounidense No. 08/437.533 (presentada el 9 de mayo de 1995), el contenido de la cual es incorporado enteramente aquí por vía de referencia.

Las moléculas de fusión de TNF inmunoreceptor útiles en los métodos y composiciones de la presente invención comprenden por lo menos una porción de una o más moléculas de inmunoglobulina y todos o una porción funcional de uno o más receptores TNF. Estas moléculas de receptores de fusión pueden ser ensambladas como monómeros, o hetero- u homomultímeros. Las moléculas de fusión de inmunoreceptores pueden ser monovalentes o multivalentes. Un ejemplo de tales moléculas de fusión de inmunoreceptores de TNF es receptor de TNF/proteína de fusión IgG. Moléculas de fusión de inmunoreceptor TNF y métodos para su producción han sido descritos en la técnica (Lesslauer y colaboradores, Eur. J. Immunol.21:2883-2886 (1991); Ashkenazi y colaboradores, proc. Natl. Acad Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Peppel y colaboradores, J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991); Kolls y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Butler y colaboradores, Cytokine 6(6):616-623 (1994); Baker y colaboradores, Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler y colaboradores, Patente estadounidense NO. 5.447.851; y Solicitud de patente estadounidense No. 08/442.133 (presentada el 16 de mayo de 1995), cada una de las cuales se incorporan aquí completamente por vía de referencia). Métodos para producir moléculas de fusión de inmunoreceptor pueden encontrarse también en Capon y colaboradores, Patente estadounidense NO. 5.116.964; Capon y colaboradores, patente estadounidense No. 5.225.538; y Capon y colaboradores, Nature 337:525-531 (1989), las cuales referencias se incorporan aquí de manera completa

Un equivalente, derivado, fragmento o región funcional de molécula receptora de TNF se refiere a la porción de la molécula receptora de TNF, o la porción de la secuencia de moléculas receptoras TNF que codifica la molécula receptora TNF, que es de tamaño y secuencias suficientes para parecerse funcionalmente a moléculas receptoras de TNF que pueden ser usadas en la presente invención (por ejemplo, ligar TNF α con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad). Un equivalente funcional de la molécula receptora TNF incluye también moléculas modificadas de receptor que funcionalmente se parecen a moléculas receptoras de TNF que pueden ser utilizadas en la presente invención (por ejemplo, ligar TNF α con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad). Por ejemplo, un equivalente funcional de molécula receptora de TNF puede contener un codón "SILENT" o una o más sustituciones de aminoácido, supresiones o adiciones (por ejemplo, sustitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido; o sustitución de un codón que codifica el mismo o diferente aminoácido hidrofóbico por otro codón que codifica un aminoácido hidrofóbico). Véase Ausubel y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Asoc., y Wiley- Interscience, Nueva York (1987-2000).

Citoquinas incluyen cualquier citoquina conocida. Véase, por ejemplo, CopewithCytokines.com. Antagonistas de citoquina incluyen, pero no están limitados a, cualquier anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier antagonista de molécula pequeña, o cualquier combinación de los mismos.

Tratamientos Terapéuticos

Cualquier método de la presente invención comprende un método para tratar un desorden mediado de integrin dual, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo de integrin antidual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia. Tal método puede comprender además opcionalmente co-administración o terapia de combinación para tratar tales enfermedades inmunes, en donde la administración de dicho al menos un anticuerpo de integrin anti-dual, porción especificada o variante del mismo, comprende adicionalmente administrar, antes concurrentemente, y/o después, al menos una forma seleccionada de al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo TNF o fragmento, un receptor o fragmento de TNF soluble, proteínas de fusión del mismo o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auronofin, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de oro y sodio, sulfato de hidroxycloroquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobial (por ejemplo, aminoglucósido, un antihongos, un antiparasítico, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, una macrolida, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobial), un antipsoriático, un corticosteroide, un

antidiarreico, un antitusivo, un anti-hemético, un anti-úlceras, un laxante, un anti coagulante, una eritropoietina (por ejemplo, alfa epoetina), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), una sargramostina (GM-CSF, Leuquina), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresivo (por ejemplo, 5 basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, una droga de reemplazo de hormonas, un modulador receptor estrógeno, un midriático, un cicloplégico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un agente antimánico, un anti-psicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un 10 simpatomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicina de asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de luecotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, alfa dormasa (Pulmozima), una citoquina o un antagonista de citoquina.

15 Típicamente, el tratamiento de condiciones patológicas es efectuado administrando una cantidad o dosis efectiva de por lo menos una composición de anticuerpo integrin anti-dual que totaliza, en promedio, un intervalo de por lo menos aproximadamente 0,01 hasta 500 miligramos de al menos un integrin anticuerpo anti-dual por kilogramo de paciente por dosis, y 20 de preferencia desde al menos aproximadamente 0,1 hasta 100 miligramos de anticuerpo por kilogramo de paciente por administración simple o administración múltiple, dependiendo de la actividad específica contenida en la composición. Alternativamente, la concentración efectiva de suero puede

practicantes médicos y, naturalmente, dependerán del estado de la enfermedad particular, actividad específica de la composición que es administrada, y del paciente particular que está bajo tratamiento. En algunos casos, para lograr la cantidad terapéutica deseada puede ser necesario
5 proveer para administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis particular monitoreada o medida, en donde las administraciones individuales son repetidas hasta que la dosis diariamente deseada o efectuada sea lograda.

10 Dosis preferidas opcionalmente pueden incluir 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,
15 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier intervalo, valor o fracción de la misma, o para lograr una concentración de suero de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20,
20 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

concentración de suero de 5000 µg/ml de concentración de suero por administración sencilla o múltiple, o cualquier intervalo, valor o fracción de la misma.

- 5 Alternativamente, la dosificación administrada puede variar según factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración; edad, salud, y peso del recipiente; naturaleza y grado de los síntomas, clase de tratamiento actual, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. Usualmente una dosis
- 10 de ingrediente activo puede ser aproximadamente de 0,1 hasta 100 mg/kg de peso de cuerpo. Ordinariamente de 0,1 a 50, y de preferencia de 0,1 a 10 mg/kg/administración o de forma de desprendimiento sostenido es efectiva para obtener resultados deseados.
- 15 Como un ejemplo no limitativo, el tratamiento de humanos o animales puede ser provisto como una dosis de una vez o periódica de por lo menos un anticuerpo de la presente invención de 0,1 a 100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mg/ka
- 20 por día en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o alternativamente o adicionalmente, al menos una semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,

adicionalmente, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 años, o cualquier combinación de los mismos, utilizando dosis sencilla, infusión o dosis repetidas.

- 5 Las formas de dosificación (composición) adecuadas para administración interna contienen en general desde aproximadamente 0,1 mg hasta cerca de 500 mg de ingrediente activo por unidad o por recipiente. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo ordinariamente estará presente en una cantidad de aproximadamente 0,5-99.999% en peso
- 10 con base en el peso total de la composición.

- Para administración parenteral, el anticuerpo puede ser formulado como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación, o provisto separadamente, con un vehículo parenteral farmacéuticamente
- 15 aceptable. Ejemplos de tales vehículos son agua, sustancia alcalina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano de 1-10%. Liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados también pueden ser utilizados. El vehículo o polvo liofilizado pueden contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y
- 20 estabilidad química (por ejemplo, buffers y preservativos). La formulación es esterilizada mediante técnicas conocidas o adecuadas.

Portadores farmacéuticos solubles son descritos en la edición más

Administración Alternativa

Muchos modelos conocidos y desarrollados pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención para administrar farmacéuticamente cantidades efectivas de por lo menos un anticuerpo anti-dual integrin de acuerdo con la presente invención. Aunque administración pulmonar es utilizada en la siguiente descripción, otros modos de administración pueden ser usados de acuerdo con la presente invención con resultados adecuados.

10 Anticuerpos integrin anti-duales de la presente invención pueden ser suministrados en un portador, tal como una solución, emulsión, un coloide, o suspensión, o como un polvo seco, utilizando cualquiera de una variedad de dispositivos y métodos adecuados para administración mediante inhalación u otros modos descritos aquí o dentro de la técnica conocida.

15

Formulaciones Parenterales y Administración

Formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipiente comunes agua estéril o salina, polialquilén glicoles, tales como glicol de polietileno, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y materiales similares. Suspensiones acuosas o aceitosas para inyección pueden ser preparadas utilizando un emulsificador o humidificador apropiado y un agente de suspensión, de acuerdo con métodos conocidos. Agentes para inyección pueden ser un agente no tóxico, no administrable oralmente

agua, solución de Ringer, solución isotónica, salina, etcétera son permitidas; como un solvente ordinario, o solvente de suspensión, puede ser utilizado aceite volátil estéril. Para estas finalidades, cualquier clase de aceite volátil y ácido graso puede ser utilizada, incluyendo aceites grasos naturales o sintéticos o semisintéticos o ácidos grasos. Mono- o di- o tri- glicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. Administración parenteral es conocida en la técnica e incluye, pero no está limitada a, medio de inyección convencionales, un dispositivo de inyección de gas a presión sin aguja según se describe en la patente estadounidense No. 5.851.198, y un dispositivo perforador láser según se describe en la patente estadounidense No. 5.839.446 completamente incorporada aquí por vía de referencia.

Suministro Alternativo

La invención se relaciona adicionalmente con la administración de al menos un anticuerpo integrin anti-dual mediante medios parenterales, subcutáneos, intramusculares, intravenosos, intraarticulares, intrabronquiales, intrabdominales, intracapsulares, intracartilaginosos, intracavitarios, intraceliales, intracelebelares, intracerebroventriculares, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiales, intraósteos, intrapélvicos, intrapericardíacos, intraperitoneales, intrapleurales, intraprostáticos, intrapulmonares, intrarectales, intrarenales, intraretinales, intraespinales, intrasinobiales, intratorácicos, intrauterinos, intravesicales, bolo, vaginales, rectales, bucales, sublinguales, intranasales, o transdérmicos. Al menos una composición de anticuerpo integrin anti-dual

particularmente en la forma de soluciones o suspensiones líquidas, para uso en administración vaginal o rectal particularmente en formas semisólidas tales, pero no limitadas a estas, cremas y supositorios; para administración bucal, o sublingual, tales como, pero no limitadas a esto, en la forma de
5 tableta o cápsulas; o intranasalmente tal como, pero no limitada a esta, la forma de polvos, gotas o aerosoles nasales o ciertos agentes; o transdermalmente tales como no limitadas a estas, un gel, ungüento, loción suspensión o sistema de suministro de parche con mejoradores químicos tales como dimetilsulfóxido ya sea para modificar la estructura de la piel o
10 para incrementar la concentración de droga en el parche transdérmico (Junginger y colaboradores, en "Drug permeation Enhancement", Hsieh, D.S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. Nueva York 1994, enteramente incorporada aquí por vía de referencia), o con agentes oxidantes de hacen posible la aplicación de formulaciones que contiene proteínas y péptidos
15 sobre la piel (WO 98/53847), o aplicaciones de campos eléctricos para crear sendas de transporte pasajero tal como electroporación, o para incrementar la movilidad de drogas cargadas a través de la piel tal como iontoforesis, o aplicación de ultrasonido tal como sonoforesis (Patentes estadounidenses Nos. 4.309.989, y 4.767.402) (las publicaciones y patentes anteriores siendo
20 completamente incorporadas aquí por vía de referencia).

Administración pulmonar/nasal

Para administración pulmonar, de preferencia, al menos una

senos. De acuerdo con la invención, al menos un anticuerpo integrin anti-
dual puede ser suministrado por cualquiera de una variedad de dispositivos
de inhalación nasales conocidos en la técnica para administración de un
agente terapéutico mediante inhalación. Estos dispositivos capaces de
5 depositar formaulaciones aerosolizadas en la cavidad de seno o alvéolos de
un paciente incluyen inhaladores de dosis medidas, nebulizadores,
generadores de polvo seco, rociadores y dispositivos similares. Otros
dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de
anticuerpos son también conocidos en la técnica. Todos tales dispositivos
10 pueden usar formulaciones adecuadas para la administración por el
suministro de un anticuerpo en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar
formados ya sea de soluciones (tanto acuosas como no acuosas) o
partículas sólidas. Inhaladores de dosis medida como el inhalador de dosis
medida Ventolin®, típicamente usan un gas propelente y requieren actuación
15 durante la inspiración (véase, por ejemplo, Wo 94/16970, WO 98/35888).
Inhaladores de polvo seco como Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo),
Diskus® (Glaxo), Inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos puestos en el
comercio por Inhale therapeutics, y el inhalador de polvo Spinhaler®
(Fisons), actuación de respiración de un polvo mezclado (patente
20 estadounidense 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO
94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, incorporados aquí
completamente por vía de referencia). Nebulizadores como AERx™
Aradigm, el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II

referencia, producen aerosoles a partir de soluciones, en tanto que lo inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco, etc. generan aerosoles de partículas pequeñas. Estos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comercialmente disponibles están destinados a ser representativos de dispositivos específicos adecuados para la práctica de esta invención, y no están destinados a limitar el alcance de la invención. De preferencia, una composición que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual es suministrado por un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Existen varias características deseables de un dispositivo de inhalación para administrar por lo menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, el suministro mediante el dispositivo de inhalación es ventajosamente confiable, reproducible, y exacto. El dispositivo de inhalación opcionalmente puede suministrar pequeñas partículas secas, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 μm de preferencia aproximadamente de 1-5 μm para buena respirabilidad.

Administración de composiciones de anticuerpo integrin dual como rocío

Un rocío que incluye proteína de composición de anticuerpo integrin dual puede ser producida forzando una suspensión o solución de por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual a través de una boquilla bajo presión. El tamaño y configuración de boquilla, la presión aplicada, y el régimen de alimentación de líquido pueden ser seleccionados para lograr la salida

capilar o de boquilla. Ventajosamente las partículas de al menos una composición de anticuerpos de integrin anti-dual de proteína suministrada por un pulverizador tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 10 μm de preferencia dentro del intervalo de 5 aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 5 μm , y con mayor preferencia de aproximadamente 2 μm hasta aproximadamente 3 μm .

Las formulaciones de al menos una composición de proteínas de anticuerpos integrin anti-dual adecuada para uso con un rociador típicamente incluyen proteína de composición de anticuerpo en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 100 mg de por lo menos una composición de anticuerpos de integrin anti-dual de proteína por ml de solución, o mg/gm, o cualquier intervalo o valor dentro del mismo, por ejemplo, pero no limitado a, .1, .2, .3, .4, .5, .6, .7, .8, .9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mg/ml o mg/gm. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un buffer, un agente de isotonicidad, un preservativo, un agente activo de superficie, y, de preferencia, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para estabilización de la proteína de composición de anticuerpo, tal como un buffer, un agente de reducción, una proteína de volumen o un carbohidrato. Proteínas de volumen útiles en la formulación de proteínas de composición de anticuerpos, incluyen albúmina,

- proteínas de composición de anticuerpos incluyen sucrosa, manitol, lactosa, trealosa, glucosa, o compuestos similares. La formulación de proteínas de composición de anticuerpos puede incluir un agente activo de superficie, el cual puede reducir o prevenir agregación inducida de superficie de la
- 5 proteína de composición de anticuerpo causada por atomización de la solución que forma un aerosol. Varios surfactantes convencionales pueden ser empleados, tales como ésteres y alcoholes de ácidos grasos de polioxietileno, y ésteres de ácidos grasos de sorbitol de polioxietileno. Las cantidades en general estarán entre 0,001 y 14% en peso de la formulación.
- 10 Agentes activos de superficie especialmente preferidos para las finalidades de esta invención son monoleato de polioxietilén sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. Agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína tal como anticuerpos integrin duales, o porciones o variaciones especificadas, también pueden ser incluidos en la
- 15 formulación.

Administración de composiciones de anticuerpos de integrin dual mediante un nebulizador

- La composición de anticuerpos proteínas puede ser administrada
- 20 mediante un nebulizador, tal como nebulizador de chorro, o un nebulizador ultrasónico. Típicamente, en un nebulizador de chorro, una fuente de aire comprimido es utilizada para crear un chorro de aire de alta velocidad a través de un orificio. A medida que el gas se expande más delante de la

conectado a un recipiente de líquido. La corriente de líquido proveniente del tubo capilar es cizallada en filamentos y gotitas inestables a medida que sale del tubo, creando el aerosol. Una gama de configuraciones, velocidades de flujo, y tipos de baffles puede ser empleada para lograr las características de desempeño deseadas de un nebulizador de chorro dado. En un nebulizador ultrasónico, energía eléctrica de alta frecuencia es utilizada para crear energía mecánica, vibracional, que emplea típicamente un transductor piezoeléctrico. Esta energía es transmitida a la formulación de proteína de composición de anticuerpos ya sea directamente o a través de un fluido acoplador, creando un aerosol que incluye la proteína de composición de anticuerpo. Ventajosamente, partículas de proteínas de composición de anticuerpo suministradas por un nebulizador tienen un tamaño de partícula menor que aproximadamente 10 μm , de preferencia dentro del intervalo de aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 5 μm , y más preferentemente aproximadamente 2 μm hasta alrededor de 3 μm .

Formulaciones de al menos un anticuerpo de integrin anti-dual adecuado para uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, incluyen típicamente una concentración de aproximadamente 0,1 mg hasta alrededor de 100 mg de por lo menos una proteína de anticuerpo integrin anti-dual por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un buffer, un agente de isotonicidad, un preservativo, un agente activo de superficie, y, de preferencia, zinc. La formulación también

proteína de composición de anticuerpo de integrin anti-dual, tal como un buffer, un agente reductor, una proteína de volumen, o un carbohidrato. Proteínas de volumen útiles para formular al menos una composición de anticuerpo integrin anti-dual de proteínas incluye albúmina, protamina, o similares. Carbohidratos típicos útiles para formular al menos un anticuerpo de integrin anti-dual incluyen sucrosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La última formulación de anticuerpo integrin anti-dual también puede incluir un agente activo de superficie, el cual puede reducir o evitar agregación inducida por superficie del al menos un anticuerpo integrin anti-dual originado por atomización de la solución en la formación de un aerosol. Varios agentes activos de superficie convencionales pueden ser utilizados, tales como ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes y ésteres de ácido graso de sorbitol de polietileno. Las cantidades variarán en general entre 0,001 y 4% en peso de la formulación. Agentes activos de superficie especialmente preferidos para finalidades de esta invención son mono-oleato de sorbitán de polioxietileno, polisorbato 80, polisorbato 20, o compuestos similares. Agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína tal como proteína de anticuerpo también pueden ser incluidos en la formulación.

20

Administración de composiciones de anticuerpo Integrin dual por un inhalador de dosis medida

En un inhalador de dosis medida (MDI), un propulsor, al menos un

comprimido licuado. Actuación de la válvula medidora pone en libertad la mezcla, como un aerosol, de preferencia, partículas que contienen en el intervalo de tamaño de menos de aproximadamente 10 μm , de preferencia aproximadamente 1 μm hasta alrededor de 5 μm y más preferentemente de 5 aproximadamente 2 μm hasta alrededor de 3 μm . El tamaño de partícula del aerosol deseado puede ser obtenido empleando una formulación de composición de anticuerpos de proteína producida mediante diferentes métodos conocidos por aquellos que tienen experiencia en la materia incluyen molienda por chorro, secamiento por pulverización, condensación de punto crítico o similares. Inhaladores preferidos de dosis medida incluyen aquellos fabricados por 3M o Glaxo y que emplean un propulsor de hidrofluorocarbonos.

Formulaciones de por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida incluirá en general un recipiente de polvo finamente dividido que contiene por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendida en un propulsor con la ayuda de un agente activo de superficie. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para esta finalidad, tal como clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, que incluye triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano 134a), HFA-227

hidrofluorocarbono. El surfactante puede ser seleccionado para estabilizar el al menos un anticuerpo integrin anti-dual como una suspensión en el propulsor, para proteger el agente activo contra degradación química, y similares. Surfactantes adecuados incluyen trioleato de sorbitán, lecitina de
5 soya, ácido oléico, o similares. En algunos casos soluciones de aerosoles son preferidas usando solventes tales como etanol. Agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína también pueden ser incluidos en la formulación.

10 Alguien de experiencia ordinaria en la materia reconocerá que los métodos de la actual invención pueden ser logrados mediante administración pulmonar de al menos composiciones de anticuerpos de integrin anti-dual a través de dispositivos no descritos aquí.

15 **Formulaciones orales y administración**

Formulaciones para uso oral dependen de la co-administración de coadyuvantes (por ejemplo, resorcinolos y agentes activos de superficie no iónicos tales como éter de oleilo de dioxitelieno y éter de n-hexadecilpolietileno) para incrementar artificialmente la permeabilidad de las
20 paredes intestinales, así como también la co-administración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir degradación enzimática. El compuesto constituyente activo de la forma de dosificación tipo sólido

dextrano, almidones, ágar, arginatos, chitinas, citosanos, peptinas, goma tragacanto, goma arábica, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímero sintético o semisintético, y glicérido. Estas formas de dosificación también pueden contener otro tipo o tipos de aditivos, por ejemplo, agente de dilución
5 inactivo, lubricante tal como estearato de magnesio, parabeno, agente preservativo tal como ácido sórbico, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, antioxidante tal como cisteína, desintegrador, aglomerador, adelgazante, agente de regulación con agente endulzante, agente saborante, agente perfumador, etcétera.

10

Tabletas y píldoras pueden ser procesadas adicionalmente en preparaciones entéricas recubiertas. Las preparaciones líquidas para administración oral incluye emulsión, jarabe, elixir, suspensión y preparaciones de solución permisibles para uso médico. Estas
15 preparaciones pueden contener agentes diluyentes inactivos ordinariamente utilizados en dicho campo, por ejemplo, agua. Liposomas han sido descritos también como sistemas de suministro de drogas para insulina y heparina (Patente Estadounidense No. 4.239.754). Más recientemente, microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mezclados (proteinoides) han sido
20 utilizados para suministrar compuestos farmacéuticos (patente estadounidense No. 4.925.673). Además, compuestos portadores descritos en la patente estadounidense No. 5.879.681 y la patente estadounidense No. 5.871.753 son utilizados para suministrar agentes biológicamente

Formulaciones mucosales y administración

Para absorción a través de superficies de mucosal, las composiciones y métodos de administrar al menos un anticuerpo o de integrin anti-dual incluyen una emulsión que comprende una pluralidad de partículas de submicrones, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo, y una fase acuosa continua, la cual promueve absorción a través de superficies mucosales logrando mucoadhesión de las partículas de emulsión (patente estadounidense No. 5.514.670). Superficies mucosas adecuadas para aplicación de las emulsiones de la presente invención pueden incluir rutas

comeales, conjuntivales, bucales, sublinguales, nasales, vaginales, pulmonares, estomacales, intestinales, y rutas rectales de administración. Formulaciones para administración vaginal o rectal, por ejemplo, supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquilén glicoles, vaselina, manteca de cacao y similares. Formulaciones para administración intranasal pueden ser sólidas y pueden contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas o aceitosas de gotas nasales. Para administración bucal excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares (patente estadounidense No. 5.849.695).

20

Formulaciones transdermales y administración

Para administración transdermal, el al menos un anticuerpo de integrin anti-dual esencapsulado en un dispositivo de suministro tal como un

se indique otra cosa). Un número de dispositivos adecuados son conocidos, que incluyen micropartículas hechas de polímeros sintéticos tales como polihidroxiácidos tales como ácido poliacético, ácido poliglicólico, y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos, y polifosfasenos, y polímeros naturales tales como colágeno, poliamino ácidos, albúmina, y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y combinaciones de los mismos (patente estadounidense No. 5.814.599).

Administración prolongada y Formulaciones

10 Puede ser en ocasiones deseable suministrar los compuestos de la presente invención al sujeto durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante períodos de una semana o un año desde una administración sencilla. Varias formas de desprendimiento lento, formas de dosificación de depósito o implante pueden ser utilizadas. Por ejemplo, una
15 forma de dosificación puede contener una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los compuestos que tiene un bajo grado de solubilidad en fluidos del cuerpo, por ejemplo, (a) una sal de adición de ácido con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamóico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácidos naftalene mono- o di- sulfónicos, ácido poligalacturónico, y similares;
20 (b) una sal con un catión de metal polivalente tal como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares, o con un catión orgánico formado a partir, por ejemplo, N,N'-dibenzil-

presente invención, o de preferencia, una sal relativamente insoluble tal como aquellas, que se acaban de describir, pueden ser formuladas en un gel, por ejemplo, gel de monoestearato de aluminio, con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para inyección. Sales particularmente preferidas son

5 sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales de pamoato, y sales similares. Otro tipo de formulación de depósito de desprendimiento lento para inyección contendría el compuesto o la sal dispersado para ser encapsulados en un polímero de baja degradación, no tóxicos, no antigénico, tal como un polímero de ácido poliláctico/ ácido poliglicólico, por

10 ejemplo según se describió en la patente estadounidense No. 3.773.919. Los compuestos o, de preferencia, sales relativamente insolubles tales como aquellas descritas anteriormente pueden ser también formuladas en píldoras cilásticas de matriz de colesterol, particularmente para uso en animales. Formulaciones adicionales de desprendimiento lento, de depósito o implante,

15 por ejemplo, liposomas de gas o de líquido son conocidas en la literatura (patente estadounidense No. 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Habiendo descrito en general la invención, la misma será más

20 fácilmente entendida mediante referencia a los ejemplos siguientes, los cuales se suministran por vía de ilustración y no son incluidos como limitantes.

Un vector de expresión de mamíferos típico contiene por lo menos un elemento promotor, el cual interviene la iniciación de transcripción de mRNA, la secuencia codificadora de anticuerpo, y señales requeridas para la terminación de transcripción y poliadenilación del material transcrito.

- 5 Elementos adicionales incluyen mejoradores, secuencias de Kozak y frecuencias que intervienen flanqueadas por sitios donores y aceptores para empalmar ARN. Transcripción altamente eficiente se puede lograr con los promotores tempranos y tardíos desde SV40, el terminal largo repite (LTRS) desde Retrovirus, por ejemplo, RVS, HTLV1, HIV1, y los promotores
- 10 primarios del citomegalovirus (CMV). No obstante, elementos celulares también pueden ser utilizados (por ejemplo, el promotor de actina humana). Vectores de expresión adecuados para uso para practicar la presente invención, incluye, por ejemplo, vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, o pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1
- 15 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) o pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSV cat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) and pBC12MI (ATCC 67109). Células huésped de mamífero que podrían ser utilizadas incluyen células Hela 293 humano, células H9 y Jurkat, células NIH3T3 de ratón, y células C127, células Cos 1, Cos 7, y CV
- 20 1, células quail QC1-3, células L de ratón y células de ovario (CHO) de hamster chino.

Alternativamente, el gen puede ser expresado en líneas celulares

higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado también puede ser amplificado para expresar
5 grandes cantidades del anticuerpo codificado. El marcador DHFR (reductasa de dihidrofolato) es útil para desarrollar líneas celulares que llevan varios cientos o aún varios millares de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima de cintasa de glutamina (GS) (Murphy y colaboradores, Biochem. J. 227:277-279 (1991), Bebbington, y
10 colaboradores, Bio/Technology 10:169-175 (1992). Utilizando estos marcadores, las células de mamífero son desarrolladas en medio selectivo y las células con la resistencia más elevada son seleccionadas. Estas líneas celulares contienen el(los) gen(es) amplificado integrado dentro de cromosoma. El ovario de hamster chino (CHO) y células NSO se usan
15 frecuentemente para la producción de anticuerpos.

Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) de Virus de Sarcoma Rous (Cullen, y colaboradores, Molec.Cell.Biol. 5:438-447 (1985)) más un fragmento del intensificador CMV (Boshart y
20 colaboradores, Cell 41:521-530 (1985)). Sitios de clonación múltiple, por ejemplo, con los sitios de desdoblamiento de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el 3' intron, la señal de poliadenilación y terminación del

Clonación y expresión en células CHO

El vector pC4 es utilizado para la expresión del anticuerpo integral. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (ATCC No. Acceso 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón bajo control del promotor temprano SV40. El ovario del hamster chino u otras células carentes de actividad de dihidrofolato que son transfectadas con estos plásmidos pueden ser seleccionadas desarrollando las células en un medio selectivo (por ejemplo, alfa menos MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementados con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes de DHFR en células resistentes al metotrexato (MTX) ha sido bien documentada (véase, por ejemplo, F.W. Alt, y colaboradores, J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); J.L. Hamlin y C. Ma, Biochem. Et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990); y M.J. Page y M.A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991)). Células desarrolladas en concentraciones en aumento de MTX desarrollan resistencia a la droga reproduciendo la enzima objetivo, DHFR, como un resultado de amplificación del gen DHFR. Si un segundo gen es articulado al gen DHFR, usualmente es co-amplificado y sobre-expresado. Se sabe en la técnica que este enfoque puede ser utilizado para desarrollar líneas celulares que llevan más de 1,000 copias del gen(es) amplificado. Subsiguientemente, cuando el metotrexato es retirado, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado dentro de uno o más cromosoma(s) de la célula huésped. El plásmido pC4 contiene para expresar el gen de interés el fuerte

fragmento aislado desde el incrementador del gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV) (Boshart, y colaboradores, Cell 41:521-530 (1985)). Hacia abajo del promotor están los sitios de desdoblamiento desde enzimas de restricción BamHI, XbaI, y Asp718 que permiten integración de los genes. Detrás de estos sitios de clonación el plásmido contiene el 3' nitron 3' y el sitio de poliadenilación del gen de preproinsulina de ratón. Otros promotores altamente eficientes también pueden ser utilizados para la expresión, por ejemplo, los promotores de b-actina humanos, los promotores SV40 tempranos o tardíos, o las repeticiones terminales largas desde otros retrovirus, por ejemplo, HIV y HTLV. Los sistemas de expresión de genes de Clontech Tet-Off y gen Tet-On y sistemas similares pueden ser utilizados para expresar el integrin dual en una manera regulada en células de mamífero (M. Gossen, y H. Bujard, proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para la poliadenilación del mRNA otras señales, por ejemplo, desde la hormona de desarrollo humano o genes de globina también pueden utilizarse. Líneas celulares estables que llevan un gen de interés integrado dentro de las hormonas también pueden ser seleccionadas por contrafección con un marcador seleccionable tal como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso utilizar más de un marcador seleccionable en la iniciación, por ejemplo, G418 más metotrexato.

El plásmido pC4 es digerido con enzimas de restricción y luego desfosforilado utilizando fosfatasa intestinal de ternero mediante

La secuencia ADN que codifica el anticuerpo de integrin dual completo es utilizado, correspondiendo a las regiones de HC y LC variables de un anticuerpo de integrin dual de la presente invención, de acuerdo con etapas de métodos conocidos. Ácido nucleico aislado que codifica una región constante humana adecuada (por ejemplo las regiones HC y LC) también es usada en esto. La región aislada variable y constante que codifica ADN y el vector desfosforilado son luego ligados con ligasa T4 ADN. Células de E.Coli HB101 o XL-1 Azul son luego transformadas y las bacterias son identificadas que contienen el fragmento insertado dentro del plásmido pC4 utilizando por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Células de ovarios de hamster chino (CHO) que carecen de un gen activo de DHFR son utilizadas para transfección. 5 µg del plásmido de expresión pC4 es cotransfectado con 0,5 µg del plásmido pSV2-neo utilizando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de anticuerpos que incluyen G418. Las células son seleccionadas en alfa menos MEM suplementado con 1 µg/ml de G418. Después de dos días, las células son tripsinizadas y sembradas en placas clonizantes de hibridoma (Greiner, Alemania) en alfa menos MEM suplementado con 10, 25, o 50 ng/ml de metotextrato mas 1 µg/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días son tripsinizados clones sencillos

utilizando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Clones que se desarrollan a las concentraciones más elevadas de metotrexato son luego transferidos a nuevos platos de seis pozos que contienen concentraciones aún más elevadas de metotrexato (1 mM, 2mM, 5mM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento es repetido hasta que son obtenidos clones que se desarrollan a una concentración de 100-200 mM. La expresión del gen deseado es analizada, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y mancha del oeste o mediante análisis de fase inversa HPLC.

Ejemplo 2: Método de hacer y caracterización de ejemplo no-limitativo de anticuerpo Integrin completamente humano.

Resumen. (CBA/J x C57/BL6/J) F₂ ratones híbridos (Taylor y colaboradores, International Immunology 6:579-591 (1993); Lonberg y colaboradores, nature 368:856-859 (1994); neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Fishwild y colaboradores, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)) que contenían transgenes de anticuerpos de región humana variable y constante tanto para cadenas pesadas como livianas fueron inmunizados con $\alpha V\beta 3$ placentar humana. Una fusión produjo 2 anticuerpos monoclonales totalmente humanos $\alpha V\beta 3$ reactivos IgG1k monoclonales, llamados GenO95 y GenO.101. Los anticuerpos totalmente humanos anti- $\alpha V\beta 3$ fueron caracterizados adicionalmente y ambos fueron encontrados ser reactivos a los heterodímeros $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ sugiriendo especificidad por la cadena alfa compartida de ambas moléculas. Un Mab, GenO.95, conocido también como CNO 95, inhibe la ligazón tanto de $\alpha V\beta 3$ como de $\alpha V\beta 5$ a vitronectina en

Abreviaturas:

BSA – albúmina de suero bovino

CO₂ – dióxido de carbono

5 DMSO – dimetilsulfóxido

EIA – Inmunoensayo de enzima

FBS – Suero de feto bovino

H₂O₂ – peróxido de hidrógeno

HC – Cadena pasada

10 HRP – peróxido de rábano picante

Ig – inmunoglobulina

IP – intraperitoneal

IV – Intravenoso

Mab – Anticuerpo monoclonal

15 OD – Densidad óptica

OPD – Dihidrocloruro de o-fenilenediamina

PEG – Polietilén glicol

PSA – Penicilina, estreptomicina, Amfotericina

RT – Temperatura ambiente

20 SQ – Subcutánea

TBS – tris buffer salino

v/v – volumen por volumen

w/v peso por volumen

Introducción:

Hemos utilizado ratones transgénicos que contiene genes de inmunoglobulina humanos de cadena pesada y liviana para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos que son específicos para

5 integrins αV . Estos anticuerpos novedosos pueden ser utilizados terapéuticamente para inhibir el proceso angiogénico bloqueando la unión de integrins αV a sus respectivos ligandos ECM y proveer herramientas adicionales en el tratamiento de diferentes cánceres.

10 Materiales y métodos**Animales**

Ratones transgénicos han sido desarrollados por GenPharm International que expresan inmunoglobulinas humanas pero no de ratón IgM o Igk. Estos ratones contienen transgenes de secuencia humana que sufren

15 juntura de V(D)J, clase de cadena pesada conmutadora y mutación somática para generar un repertorio de inmunoglobulinas de secuencia humana (Taylor y colaboradores, International Immunology 6:579-591 (1993)). El transgen de cadena liviana es derivado en parte de una levadura artificial de clon de cromosoma que incluye de aproximadamente la mitad de la región

20 V_k de germinalina humana. Además de varios genes VH , el gen de cadena pesada (HC) codifica tanto humanos μ como humanos $\gamma 1$ (Lonberg y colaboradores, nature 368:856-859 (1994)) y/o regiones constantes $\gamma 3$. Un ratón del lado de linaje genotípico HC012 fue utilizado en el proceso de

Purificación de $\alpha V\beta 3$ humano

Placenta humana (rota utilizando un molidor de carne) o células M21 de melanoma humano que expresan el integrin $\alpha V\beta 3$ fueron extraídas con
5 solución salina que contenía 20 mM tris pH 7.5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 100 mM de octiltioglucoído (OTG proveniente de Pierce), 0,05% de azida de sodio y 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma). La mezcla fue agitada durante 1 hr a temperatura ambiente y clarificada mediante centrifugación a 10,000 xg. El líquido sobrenadante proveniente de extractos
10 placentales fue aplicado a una columna de afinidad formada por Mab 10E5 acoplada a sefarosa (Pharmacia) para retirar GPIIb/IIIa y la fracción de flujo transversal fue aplicada a una columna de afinidad formada por Mab c7E3 Fab acoplada a sefarosa (Pharmacia) para unir $\alpha V\beta 3$. La columna de c7E3 fue lavada con PBS que contenía 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , y 0,1% OTG
15 seguido por acetato de sodio 0.1 M de pH 4,5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , y 0,1% OTG, pH 3.0. La columna fue extraída con glicina 0,1M, ácido acético al 2%, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , y 0,1% OTG. El material eluctado que contenía $\alpha V\beta 3$ purificado fue neutralizado utilizando tris 2M de pH 8.5. La pureza de la preparaciones fue caracterizada por análisis de SDS-PAGE y
20 ELISA para excluir contaminación GPIIb/IIIa (Wayner, y colaboradores, J. Cell Biol.. 113: 919-929 (1991)).

Inmunizaciones

Un ratón macho castrado quirúrgicamente de 15 a 17 semanas de edad obtenido desde GenPharm fue IP inmunizado (200 μ L) y en 2 sitios SQ (100 μ L por sitio) con un total de 20 μ g de α V β 3 placentar (prep.. fracción V, JG21197) emulsificada con un volumen igual de adyuvante de Freund completo (día 0). El ratón fue inmunizado dos semanas más tarde en la misma manera con α V β 3 emulsificada con un volumen igual de adyuvante de Freund incompleto. Tres inyecciones subsiguientes de 10 μ g IP/ 10 μ g SQ con adyuvante incompleto de Freund fueron administradas en 28, 42, y 56 días. El ratón fue entonces sangrado en los días 42 y 56 mediante punción retro-orbital sin anticoagulante. La sangre fue dejada coagular a RT durante 1 hora y el suero fue recogido y titulado utilizando un ensayo EIA α V β 3 de fase sólida. La fusión, llamada GenO, fue llevada a cabo cuando inyecciones repetidas no hicieron aumentar los títulos. En tal momento, el ratón con un título específico de IgG de 1:1280 contra α V β 3 fue aplicada una IV inyección de refuerzo final de 10 μ g α V β 3 diluida en 100 μ l de solución salina fisiológica. Tres días más tarde, el ratón fue eutanizado mediante dislocación cervical y el bazo fue removido ascépticamente y sumergido en 10 mL de solución salina buffer de fosfato fría (PBS) que contenía 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, y 0,25 μ g/mL de amfotericina B (PSA). Los esplenocitos fueron cosechados sometiendo a perfusión estéril el hígado con PSA-PBS. Las células fueron lavadas una vez en PSA-PBS frío, se contaron utilizando colorante azul de trypan de exclusión y nuevamente

Líneas celulares

El partícipe de fusión de mieloma de ratón no secretante, SP2/0 fue recibido en Servicio de Biología de Células, grupo (CBS) en 9-1-93. La línea celular fue expandida en medio α MEM (modificado) de (JRH Biosciences) suplementado con 10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs), 1mM de piruvato de sodio, 0,1 mM de NEAA, 2 mM de L-glutamina (todos de JRH Biosciences) y criopreservados en FBS al 95% y en DMSO al 5% (Sigma), luego almacenados en un congelador de nitrógeno líquido en fase de vapor en CBS. El banco de células era estéril (Quality Control Centocor, Malvern) y libre de micoplasma (Bionique Laboratories). Las células fueron mantenidas en cultivo de fase prolongada hasta fusión. Fueron lavadas en PBS, contadas, y se determinó la disponibilidad (>95%) mediante exclusión de colorante azul de tripan antes de la fusión.

15

La línea celular M21, que expresa un melanoma humano, los integrins α V β 3 y α V β 5, fue expandida y criopreservada. El banco de células de investigación de 10 botellitas fue recibido en Cell Biology Services y almacenado en nitrógeno líquido. El banco de células era estéril y libre de micoplasma (Bionique Laboratories). La línea celular MDAMB435L2 , un carcinoma de pecho humano, fue un obsequio del Dr. Janet Price (MD Anderson, Houston TX) expresa el integrin α V β 3. La línea celular fue criopreservada en Cell Biology Services. El banco de células era estéril y

20

MDAMB435L2 fueron licuadas, propagadas en los medios apropiados y mantenidas en fase log durante varios días antes de uso en bioensayos o se dejaron alcanzar con fluencia para uso en purificación de proteína $\alpha V\beta 3$ (células M21).

5

Fusión de Células

La fusión fue llevada a cabo a una relación de 1:1 de células de mieloma de murina (SP2/0) a células de bazo disponibles. Brevemente, las células de bazo y las células de mieloma fueron conformadas en pelotillas entre sí. La pelotilla fue suspendida lentamente, durante 30 segundos, en solución, al 50% (peso/volumen) de PEG/PBS (peso molecular de PEG 3,000, Sigma) a 37°C. La fusión fue detenida agregando lentamente 1 mL de PBS (JRH) (37°C) de Dulbecco durante un minuto. 19 mL adicionales de PBS fueron agregados durante los 90 siguientes segundos. Las células fundidas fueron centrifugadas durante 5 minutos a 750 rpm. Las células fueron entonces nuevamente suspendidos en un medio HAT (α MEM medio que contenía 20% de suero bovino fetal (JRH), 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 μ g/mL de gentamicina, 2,5% de suplemento Origen de cultivo (Fisher), 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 100 μ M de hipoxantina, 0,4 μ M de aminopterina, y 16 μ M de timidina) y luego se plateó a 200 μ L/pozo en trece platos de cultivo de tejido de 96 pozos de fondo plano. Las placas fueron luego colocadas en un incubador humidificado a 37°C que contenía 5% CO₂ y 95% de aire durante

10

15

20

Detección de anticuerpos humanos IgG anti- $\alpha V\beta 3$ en suero de ratón

La fase sólida EIAs fue utilizada para tamizar suero de ratón para anticuerpos humanos IgG específicos para $\alpha V\beta 3$ humano. Brevemente, los
5 platos fueron recubiertos con $\alpha V\beta 3$ a 1 $\mu\text{g/mL}$ en PBS durante la noche. Después de lavar en solución salina de 0,15 M que contenía 0,02% (v/v) de Tween 20, los pozos fueron bloqueados con 1% (w/v) de BSA en HBSScon Ca^{++} y Mg^{++} , 200 $\mu\text{L/pozo}$ durante 1 horas a RT. Los platos fueron usados inmediatamente o congelados a -20°C para uso futuro. Sueros de ratón
10 fueron incubados doblando diluciones en los platos recubiertos de $\alpha V\beta 3$ a 50 $\mu\text{L/pozo}$ a RT durante 1 hora. Los platos fueron lavados y luego probados con 50 $\mu\text{L/pozo}$ de HRP-rotulado de IgG anti-humano de cabra, Fc específico (Aproximado) diluido a 1:30,000 en 1% de BSA-PBS durante 1 hora a RT. Los platos fueron lavados nuevamente y 100 $\mu\text{L/pozo}$ de la
15 solución de sustrato de citrato-fosfato (0,1M ácido cítrico y 0,2M fosfato de sodio, 0,01% de H_2O_2 y 1 mg/mL de OPD) fue agregada durante 15 minutos a RT. Luego se añadió solución de detención (ácido sulfúrico 4N) a 25 $\mu\text{L/pozo}$ y se leyeron a 490 nm a través de un espectrofotómetro de placa automatizado.

20

Detección de Inmunoglobulinas totalmente humanas en hibridoma flotante

Puesto que el ratón xenPharm es capaz de generar cadenas de

positivo que secretan inmunoglobulinas totalmente humanas fueron detectadas utilizando dos sistemas separados de EIA. Las placas fueron recubiertas tal como se describió anteriormente y capas sobrenadantes diluidas de hibridoma fueron incubadas sobre las placas durante 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas y probadas ya sea con HRP rotulado kappa anti-humano de cabra (Southern Biotech) anticuerpo diluido a 1:10.000 en BSA-HBSS al 1% o HRP rotulado anticuerpo específico IgG Fc anti-humano de cabra diluido a 1:30.000 en BSA-HBSS al 1% durante una hora a 37°C. Las placas fueron luego incubadas con solución de sustrato según se describió anteriormente.

Determinación de isotipos

La determinación de isotipo de los anticuerpos fue llevada a cabo utilizando un EIA en un formato similar al utilizado para medir el suero inmune de ratón para títulos específicos. $\alpha V\beta 3$ fue recubierto sobre placas de 96 pozos según se describió anteriormente y anticuerpo purificado a 2 $\mu\text{g/mL}$ fue incubado sobre la placa durante 1 hora a RT. La placa fue lavada y probada con HRP rotulada IgG₁ anti-humano de cabra (Sitio de Unión) o rotulado HRP de cabra anti-humano IgG₃ diluido a 1:4000 (Zymed) en BSA-HBSS al 1% durante una hora a RT. La placa fue de nuevo lavada e incubada con solución de sustrato según se describió anteriormente.

Características de unión de anticuerpos monoclonales humanos

Características de unión para los anticuerpos fueron valoradas utilizando una EIA de captura de $\alpha V\beta 3$. Placas de Linbro fueron recubiertas con $\alpha V\beta 3$ a $1\mu\text{g/ml}$ en TBS con calcio 2 mM durante la noche a 4°C . Las placas fueron lavadas y bloqueadas con TBA/ BSA al 1%/ calcio durante por lo menos una hora a temperatura ambiente. Anticuerpos purificados fueron incubados en diluciones en duplicado desde una concentración de partida de dos $\mu\text{g/mL}$. Las placas fueron lavadas y anticuerpos conjugados (HRP-rotulados IgG Fc anti-humanos de cabra rotulados HRP a 1:30.000) fueron agregados e incubados sobre placas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas y sustrato de OPD fue agregado a los pozos. Las placas fueron leídas mediante un espectrofotómetro de placas automatizado.

Competencia de ligamento de GenO95 a células M21 mediante diferentes Mabs comerciales anti-integrin

Células M21 fueron tripisinizadas desde matraces de cultivo, lavadas y vuletas a suspender en HBSS/calcio a 2×10^6 célula/mL. El GenO95 fue prerrotulado con FITC-cabra anti-humano Fc (Jackson) durante 30 minutos da RT. Concentraciones de 10 X de GenO95 de $200\mu\text{g/mL}$ o $20\mu\text{g/mL}$.

5

10

fueron incubadas con IgG anti-humano de FITC de cabra a 2,50 $\mu\text{g/mL}$. Alícuotas de 100 μL de células M21 (2×10^5 células) fueron incubadas con 12 μL de 10X GenO95 a altas (20 $\mu\text{g/mL}$ final) y bajas (2 $\mu\text{g/mL}$ final) concentraciones $\pm$ 12 μL de los siguientes anticuerpos de murina: m7E3 IgG, anti- $\alpha\text{V}\beta 3$ (clon LM609, Chemicon), anti- $\alpha\text{V}\beta 5$ (clon P1F6, Gibco), anti- $\beta 3$ (Chemicon, AMAC), o anti- αV (clon VNR139, Gibco) anticuerpos (a 20 $\mu\text{g/mL}$) durante 45 minutos a 37°C. Una alícuota fue removida de cada tubo (para análisis de dos colores) y la parte restante fue fijada con paraformaldehído al 1% y analizada en un citómetro de flujo. Para el análisis de dos colores, una parte alícuota (50 μL) fue incubada con IgG anti-ratones de PE-cabra durante 30 minutos a RT para rotular anticuerpos de murina anti- $\alpha\text{V}\beta 3$. anti- $\alpha\text{V}\beta 3$. anti- $\beta 3$. o anti- αV para análisis de dos colores. Todos

Inhibición de $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$ dependiente de adhesión de células M21 o de células MDAMB435L2 a placas recubiertas con vitronectina mediante Mabs específicos de $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$.

- 5 Placas Linbro fueron recubiertas durante 1 hora a temperatura ambiente con 50 μ L/pozo de vitronectina (Collaborative, Becton Dickinson) a 5 μ g/mL en TBS que contenía 2 mM de calcio y 1% de BSA durante 30 minutos a RT. Células M21 fueron tripsinizadas, lavadas una vez con medio que contenía FCS y se volvieron a suspender en 3 mL de HBSS sin calcio.
- 10 Todos los lavados fueron hechos con giros de 10 minutos a 1000 rpm en la centrífuga de tabla de mesa Sorvall. Para rotular fluorescentemente, las células, se añadió calceína (sondas moleculares) (5 mg/mL en DMSO) a las células hasta una concentración final de 100 μ g/mL en un tubo cónico de 50 mL (envuelto en lámina). Las células fueron incubadas de 10 a 15 minutos a
- 15 37°C. Células rotuladas con calceína fueron lavadas una vez con HBSS y se volvieron a poner en suspensión en HBSS suplementado con 0,1% de BSA y 1 mM de $MgCl_2$. Los anticuerpos fueron titulados (series de dilución de 14 veces) en HBSS/0,1% de BSA/ 2 mM de calcio a concentración final de 10X. Las células (300 μ L a $7,5 \times 10^6$ / mL) fueron preincubadas con soluciones de
- 20 anticuerpos (37 μ L de solución de 10X) $\pm$ de anti- $\alpha V\beta 5$ (P1F6) ascites (Chemicon) (37 μ L de 1:600 (10X)) durante quince minutos a 37°C. La mezcla de células y anticuerpos fue agregada a las placas recubiertas con vitronectina a 100 μ L por pozo en triplicado (aproximadamente 6×10^5

células no ligadas fueron retiradas por dos lavados con HBSS/calcio (150 μ L/pozo). Se añadieron 100 μ L de HBSS/calcio a cada pozo y la placa se leyó sobre el Fluoroskan a 485-538 nm.

- 5 En un ensayo separado, células de carcinoma de pecho humano de MDAMB435L2 fueron cosechadas con versene y suspendidas en suero libre de medios a 500000 células/mL y se incubaron con diferentes concentraciones de GenO95. Después de 10 minutos de suspensión de células de tumor (100 μ L) fue agregado a vitronectina (10 μ g/mL) recubierto
- 10 con placas de Linbro e incubado a 37°C. Después de 1 hora, los pozos fueron lavados tres veces con suero libre de medios (200 μ L/lavado) y el MTT basado en Célula Título AQ de colorante (Promega) fue agregado a cada pozo. El grado de adhesión de células fue determinado en un lector de placa ELISA end onde OD490 nm es directamente proporcional a la
- 15 adhesión de células. La adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como control negativo.

Determinación de dependencia de Ca⁺⁺ para conexión de Mabs VV33/VV35 anti-humanos a sus ligandos

- 20 Para determinar la dependencia catiónica en la unión de CNTO 95 y C372 a VV33 o VV35, una fase líquida EIA fue utilizada. Placas EIA (Coming) fueron recubiertas con CNTO 95, C372, c/E3 o LM609 IgG Mabs a 10 :g/mL en buffer de recubrimiento de carbonato durante la noche a 4EC.

o en ausencia de 2 mM Ca^{++} durante por lo menos una hora a 37EC. Doblando diluciones de $\alpha\text{V}\beta 3$ (log JG52599) o partiendo de $\alpha\text{V}\beta 3$ (Chemicon) partiendo a 10 :g/mL fueron preincubados con 50 mM de EDTA (Sigma) en 1% de BSA/HBSS sin Ca^{++} o con 1% de BSA/HBSS con Ca^{++} durante 30 minutos a 37EC. Las mezclas fueron agregadas entonces a las placas y se incubaron durante 30 minutos a 37EC. Las placas fueron entonces lavadas y se añadieron Mabs no competidores a las placas como sigue: a las placas recubiertas con CNT095, C372, c7E3 para detectar $\alpha\text{V}\beta 3$ ligador, se agregó Mab LM609 a 20 :g/mL en 1% de BSA/HBss $\alpha\text{V}\beta 3$ Ca^{++} , a la placa recubierta con LM609 para percibir aglomerante $\alpha\text{V}\beta 3$, de añadió Mab CNT095 a 20 :g/mL en BSA/HBSS al 1% $\alpha\text{V}\beta 3$ Ca^{++} ; a las placas recubiertas con CNT095, C372, c7E3 recubiertas para detectar aglomerante se agregó Mab VNR139 (Gibco) a 10 :g/mL en BSA/HBSS al 1% $\alpha\text{V}\beta 3$ Ca^{++} y se incubó durante 30 minutos a 37EC. Las placas fueron lavadas nuevamente y se probaron o con HRP rotulado cabra anti-ratón IgG Fc o HRP rotulado IgG Fc de cabra en buffer apropiado y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas fueron lavadas, sustrato de OPD fue agregado y el OD 490 fue medido según se describió anteriormente.

20 Resultados y discusiones

Generación de anticuerpos monoclonales totalmente humanos de integrin de $\alpha\text{V}\beta 3$ anti-humano

Una fusión, llamada GenO, fue llevada a cabo a partir de un ratón

tamizaron híbridos 129 de crecimiento positivo. Dos líneas celulares de hibridoma fueron identificadas que secretaron anticuerpos IgG totalmente humanos reactivos con $\alpha V\beta 3$ humano. Estas dos líneas celulares, GenO.95.9.12 y GenO.101.17.22, cada una secreta inmunoglobulinas del isotipo humano IgG1 κ y ambos fueron suncionados dos veces limitando la dilución para obtener líneas celulares estables (> 90% homogéneas). Al GenO.95.9.12 fue asignado el C-código #CNTO 95 y al GenO.101.17.22 fue asignado el C-código #C372A. Cada una de las líneas celulares fue congelada en bancos de células de investigación de 12-botellitas almacenadas en LN2.

Características de unión de anticuerpos monoclonales humanos mediante EIA

El análisis ELISA confirmó que el anticuerpo purificado a partir de los dos hibridomas, CNTO 95 y C372A, unen $\alpha V\beta 3$ en una manera dependiente de la concentración. La figura 1 muestra los resultados de la eficiencia de unión relativa de los anticuerpos. Unión del 50% es lograda a 0,07 y 0,7 $\mu\text{g/mL}$ para C372A y CNTO 95 respectivamente. En el mismo ensayo, c7E3 IgG demostraron unión máxima del cincuenta por ciento a 0,07 $\mu\text{g/mL}$.

Composción de ligadura de Mab GenO95 a células M21 mediante anti-Integrin Mabs comercialmente disponibles

Por análisis de un solo color, ninguno de los anticuerpos de murina

células M21 (Tabla 1). Este experimento demuestra también que el CNTO 95 se une a células M21 en una manera dependiente de la dosis. El análisis de dos colores demostró que los anticuerpos de murina anti- $\alpha_v\beta_3$, anti- $\alpha_v\beta_5$, anti- β_3 , o anti- α_v eran capaces de ligarse a células M21 (no se muestran 5 datos).

Tabla 1: Competencia de unión de GenO95 a células M21 mediante Mabs de Murina anti-Integrin

Anticuerpo Competidor	FITC de cabra anti-humano Fc-rotulado GenO95			
	2 μ g/mL		20 μ g/mL	
	MCF	% Positivo	MCF	% Positivo
Negativo (no GenO95)	2,69		2,69	
Positivo (salina)	4,33	100%	14,33	100%
M7E3 IgG	5,73	132%	14,72	103%
LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$)	4,78	110%	13,34	93%
anti- β_3 (Chemicon)	5,42	125%	13,10	91%
anti- β_3 (AMAC)	4,61	106%	13,10	91%
P1F6	4,87	112%	14,46	101%
VNR139 (anti- α_v)	4,61	106%	14,86	104%

10 MCF = Fluorescencia de canal medio

Inhibición de $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ dependientes de célula M21 o Adhesión de

MEMBRANA DE

Las células M21 se adhieren a placas recubiertas con vitronectina en una manera dependiente de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. Por lo tanto, bloqueo tanto de $\alpha V\beta 3$ como de $\alpha V\beta 5$ es requerido para inhibir completamente adhesión de células M21 a placas recubiertas con vitronectin. El C372A no inhibió

5 adhesión de células M21 en presencia o en ausencia de P1F6, anti- $\alpha V\beta 5$ ascites (Figura 2). GenO95 (CNTO 95) inhibió completamente adhesión de las células M21 a placas recubiertas con vitronectina tanto con como sin anti- $\alpha V\beta 5$ (P1F6) ascites, indicando que el anticuerpo bloquea tanto $\alpha V\beta 3$ como $\alpha V\beta 5$. Como un control para los parámetros de ensayo, ReoPro (c7E3

10 Fab) que bloquea $\alpha V\beta 3$ (en adición a GPIIb/IIIa) fue incluido. El ReoPro solo inhibió parcialmente adhesión de célula M21, Reopro en presencia de anti- $\alpha V\beta 5$ (P1F6) ascites inhibió completamente adhesión, lo cual demuestra que las células M21 se ligan a vitronectin a través tanto de integrins $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$. Los datos fueron normalizados hasta porcentaje de la unión máxima de

15 células M21 en ausencia de antagonista +/- anti- $\alpha V\beta 5$ (P1F6) ascitis. Para titulación de antagonista sin P1F6, los datos fueron normalizados a unión máxima de células M21 en ausencia de antagonista o P1F6. para titulación de antagonista en presencia de P1F6, los datos fueron normalizados hasta la ligazón máxima en ausencia de antagonista pero en presencia de P1F6.

20 Los datos fueron representados gráficamente como porcentaje de ligazón máxima (sin anticuerpo) y se realizó regresión no lineal utilizando el Prisma GraphPad.

El Mab GenO95 demostró también la capacidad para inhibir completamente adhesión de la célula MADMB435L2 a vitronectin a una concentración mínima de 1,5 µg/mL (Figura 3). Estos datos, en combinación con los datos que indican inhibición de adhesión de células M21, confirman la capacidad del GenO95 para inhibir funcionalmente la interacción del receptor $\alpha V\beta 3$ y/o el receptor $\alpha V\beta 5$ con vitronectina.

Determinación de dependencia de Ca^{++} para aglomeración de Mabs $\forall V\beta 3/\forall V\beta 5$ anti-humanos a sus ligandos

Se sabe que la presencia del catión calcio es necesaria para que el Mab c7E3 se una a $\forall V\beta 3$ y no es un requisito para la unión de Mab LM609 a $\alpha V\beta 3$ según se demostró en las Figuras 4c y 4d respectivamente. Este experimento fue conducido para valorar si la dependencia de calcio también se aplica a las características de unión de CNTO 95 o C372 para integrins $\forall V\beta 3$ o $\forall V\beta 5$. Un exceso de concentración de EDTA fue introducido dentro del formato del ensayo para quelar el Ca presente dentro del bolsillo de unión de los heterodímeros de integrin, y por lo tanto, la unión fue valorada en ausencia del catión. Se encontró que el enlace de CNTO 95 y C372 a $\forall V\beta 3$ no es dependiente de la presencia de Ca (Figura 4a, 4b). Lo mismo es cierto para el enlace entre CNTO 95 y $\forall V\beta 3$ pero no así, no obstante, para el enlace entre C372 a $\forall V\beta 5$ (Figura 4e, 4f) a medida que la ligadura parece ser incrementada en presencia de Ca.

La fusión de GenO fue llevada a cabo utilizando esplenocitos provenientes de un ratón híbrido que contenía transgenes humanos variables de anticuerpo de región constante, que fue inmunizado con $\alpha V\beta 3$. Se generaron dos anticuerpos totalmente humanos de $\alpha V\beta 3$ reactivo IgG monoclonal del isotipo IgG1k. Estos Mabs fueron caracterizados adicionalmente y se encontró que ambos ligan integrins $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. La unión de los dos Mabs se demostró que es independiente de Ca a $V\beta 3$ y dependiente de calcio a $V\beta 5$ solamente para la unión de C372. Además, un Mab, GenO95 (CNTO 95), es capaz de inhibir completamente la ligazón de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ al ligando de vitronectina en ensayos basados en la célula. Este Mab puede demostrar ser útil en aplicaciones relacionadas con cáncer y otras aplicaciones anti-angiogénicas.

Referencias:

1. Taylor y colaboradores, International Immunology 6:579-591 (1993).
2. Longberg y colaboradores, Nature 368:856-859 (1994).
3. Neuberger, nature Biotechnology 14:826 (1996).
4. Fishwild y colaboradores, nature Biotechnology 14:845-851 (1996).
5. Gastl y colaboradores, Oncology 54:177-184 (1997).
6. Eliceiri y colaboradores, J. Clin. Invest. 103: 1227-1230 (1999).
7. Fierdlander y colaboradores, Science 270: 1500-1502 (1995).
8. Wayner, y colaboradores, J.Cell Biol. 113: 919-929 (1991).

INTRODUCCIÓN

GenO.95, también conocido como CNTO 95, es un anticuerpo humano monoclonal generado inmunizando (CBA/J x C57/BL6/J, GenPharm International) ratones F2 híbridos con integrin $\alpha_v\beta_3$ purificado desde placenta humana. El anticuerpo está compuesto de variable humana y regiones constantes de IgG1 kappa y es encontrado que es reactivo tanto a $\alpha_v\beta_3$ como a $\alpha_v\beta_5$, sugiriendo una especificidad por la cadena alfa compartida por ambas moléculas de integrin.

10 OBJETIVO

La finalidad de este estudio consiste en caracterizar la afinidad de unión de integrins GenO95 para $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$, purificados y para beta integrin que expresa líneas celulares. Para caracterización adicional, los valores de unión serán comparados entre GenO95 y Reopro.

15

ABREVIATURAS

Kd, constante de equilibrio de disociación, expresada en M

Bmax = número máximo de sitios de unión.

20 MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La células A375S2, una línea celular de melanoma humano que expresa integrins $\alpha_v\beta_3$, y $\alpha_v\beta_5$, fueron cultivados en medios (DMEM) mínimos

Células Labs), piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2mM (todos provenientes de JRH Biosciences).

Células HT29, una línea celular de carcinoma de colon humano que
5 expresa $\alpha_v\beta_5$, y $\alpha_v\beta_3$ nominal (NB 4546,p207) fueron cultivadas en DMEM que contenía 10% de FBS, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2mM.

Células M21, un melanoma humano que expresa integrins $\alpha_v\beta_3$, y
10 $\alpha_v\beta_5$, obtenidas del Dr. J. Jakubowski (Eli Lilly, Inc.), fueron cultivadas en medios RPMI (JRH Biosciences) que contenían 10% de FBS, piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2mM.

Integrins

15 Un lote de $\alpha_v\beta_3$, JG22499 fue purificado en Centocor de placenta humana. Otra porción de integrin $\alpha_v\beta_3$, (formulación de octilo, porción 19100991) fue comprada de Chemicon. $\alpha_v\beta_5$, (formulación de triton, lote 20030055, lote 1910990 y formulación de octilo, lote 19060747) fue comprada de Chemicon.

20

Anticuerpos

GenO.95 fue purificado a partir de cultivo de células sobrenadantes por cromatografía de proteína A. ReoPro fue fabricado en Centocor, Inc.

y lote 1910329) y P1F6, un anticuerpo de murina anti-humano $\alpha_v\beta_5$, (1961 P-K, lote 17110560) fueron comprados de Chemicon.

Radiorotulación

- 5 Anticuerpos fueron radiorotulados con ^{125}I Na (Amersham, IL) utilizando Iodoperlas (Pierce Chemicals, IL) hasta una actividad específica de 1-2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. La concentración de anticuerpos (mg/ml) fue determinada dividiendo la adsorción (OD/ml) a 280 nm por 1.4. La actividad específica del anticuerpo yodado fue determinada diluyendo el anticuerpo y contando una
- 10 parte alícuota en el contador gamma o Topcounter (Packard).

$$\text{Actividad específica (cpm/ug)} = \frac{\text{cpm/ volumen (ml)} \times \text{factor de dilución}}{\text{concentración } (\mu\text{g/ml determinada por lectura OD}_{280})}$$

15 Ensayo de conexión de placa recubierta con integrin

- Integrin $\alpha_v\beta_3$, o $\alpha_v\beta_5$, fue diluido hasta 1 $\mu\text{g/ml}$ en solución salina tris-amortiguada (TBS, Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) que contenía cloruro de calcio 2 mM (TBS/ Ca^{++}) y recubierto a 50 μl por pozo sobre placas Linbro de poliestireno de 96 pozos (Flujo/ICN) durante la noche a 4°C. Las
- 20 placas fueron lavadas con TBS/ Ca^{++} y bloqueadas con albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en TBS/ Ca^{++} durante 1 hora a temperatura ambiente. Cincuenta microlitros de anticuerpo diluido fueron agregados por triplicado a pozos recubiertos e incubados durante 2 h a 37°C. Después de tres lavados

1:40:000 en BSA-TBS al 1% fue agregada e incubada durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces, y desarrolladas con solución de sustrato de hidrocioruro de o-fenilenediamina (OPD, Sigma) compuesta de ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sodio 0,2 M, 5 0,01% H_2O_2 y 1 mg/ml OPD. El desarrollo de color fue detenido después de 15 minutos a temperatura ambiente con H_2SO_4 0,3 N, y las placas fueron leídas a OD_{490} nm en el lector de placas Molecular Dynamics.

Se generaron curvas de unión con PRISM GraphPad (versión 3, 10 Software GraphPad). Los resultados fueron expresado como % máximo de unión del valor de saturación. K_d , la constante de equilibrio de ligamento de disociación (expresada como M), fue determinada a partir de un ajuste de regresión no-lineal de los datos que utilizan PRISM.

15 Ensayo de unión de células

Cincuenta microlitros de anticuerpo radiorotulado diluido en medio RPMI al 2% que contenía 2% de albúmina de suero bovino (JRH Biosciences) fueron agregados en triplicado a células confluentes cultivadas en placas de cultivo de tejido de 96 pozos (Packard). Las células fueron 20 incubadas durante 1,5 h a 37°C; se lavaron tres veces suavemente con solución salina buffer de Hanks que contenía calcio y magnesio (HBSS++, JRH Biosciences) y luego se aspiró. Cien microlitros de Mycosinct 20 (Packard) fueron añadidos por pozo, y se cuantificó la radioactividad de

Para determinar ligazón no específica, se llevaron a cabo experimentos con un grupo similar de diluciones en presencia de exceso de 100 veces de anticuerpo no rotulado.

5 Para determinar el número de células plantadas en cada pozo, células provenientes de varios pozos fueron removidas con tripsina, aglomeradas y contadas bajo el microscopio. El número de receptores por célula fue calculado como sigue:

Número receptor/Célula =
$$\frac{\text{Índice específico cpm} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{\text{Actividad específica (cpm/g)} \times \text{peso. Molec. (g/mol)} \times \text{no. de células}}$$

10 B_{máx}, los sitios máximos de unión por célula, y el K_d fueron determinados a partir de un ajuste de regresión no lineal, de los datos utilizando PRISM.

15 **Resultados y Discusión**

La determinación de los valores de afinidad de ligamento fue llevada a cabo midiendo el ligamento de varias concentraciones de GenO.95 (y ReoPro) a integrins purificados de α_vβ₃, y α_vβ₅, y a receptores superficiales de células en equilibrio. Las curvas de unión de saturación fueron hipérbolas rectangulares, sugiriendo un solo sitio de unión de receptor para GenO.95 y ReoPro (Figs. 5-6; Motulsky H, 1999). Se realizaron análisis de estos datos de unión de saturación (llamados en ocasiones experimentos de Scatchard) fueron llevados a cabo utilizando un ajuste de regresión no lineal de hipérbola de un solo sitio en PRISM para obtener una afinidad K_d y número

Varios lotes de GenO.95, ReoPro e integrins purificados fueron usados para asegurar una determinación precisa de los valores de afinidad de unión. La curva de saturación de unión de GenO.95 sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_3$, (Fig. 5A), y la curva de unión de ReoPro sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 5B), se muestran como la media y la desviación estándar de seis experimentos separados. Los resultados obtenidos con la formulación de Tritón de $\alpha_v\beta_3$ fueron encontrados más consistentes que aquellos obtenidos con la formulación de octilo. Sobre placas recubiertas con $\alpha_v\beta_3$, la media de GenO.95 Kd fue de $2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$ M; y la media de ReoPro Kd fue de $2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$ M.

La curva de saturación de ligamento de GenO.95 sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_5$ (Fig. 6A) y la curva de ligamento de reoPro sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_5$ (Fig. 6B) son mostradas como la media y la desviación estándar de seis experimentos separados. Los resultados obtenidos con la formulación de octilo fueron más consistentes que los obtenidos con la formulación de Tritón. La media Kd de GenO.95 sobre $\alpha_v\beta_5$ fue de $2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$ M. El ReoPro no mostró ligamento y ninguna respuesta de dosis sobre placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$.

Los valores de afinidad de ligamento para integrins purificados fueron comparados con ligamento a receptores expresados sobre varias líneas

células A375S2 las cuales expresan $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (Fig.7A). Los valores de afinidad media sobre células A375S2 fueron: $K_d = 5,2 \pm 2,04 \times 10^{-9}$ M, y 120.000 ± 37.000 receptores/célula. Las células HT-29 expresan $\alpha_v\beta_5$. Los valores de afinidad para ligamento de GenO.95 y 125-I con células HT-29 fueron: $K_d = 1,3 \pm 3,76 \times 10^{-10}$ M; y 81.000 ± 24.000 receptores/célula (Fig. 7B). Las células M21 expresan integrins $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. 125-I Gen.O95 que se unieron a células M21 fueron: $K_d = 8,5 \pm 3,03 \times 10^{-9}$ M; y 200.000 ± 80.000 receptores/célula (Fig. 7C).

Estudios similares de ligamento de células fueron llevados a cabo con 125-I ReoPro sobre varias líneas celulares. La Figura 8A-C muestra la unión de 125-I ReoPro con células A375S2 y las medias obtenidas fueron: $K_d = 22 \pm 3,7 \times 10^{-9}$ M; y 370.000 ± 190.000 receptores/célula (Fig. 8A). Sobre células HT-29, el 125-I ReoPro mostró ligamento mínimo (Fig. 8B). Ligamento 125-I ReoPro a células M21 mostró: $K_d = 10 \pm 2,00 \times 10^{-9}$ M y 660.000 ± 120.000 receptores/célula (Fig. 8C). Los valores de ligamento de 125-I ReoPro sobre células M21 son consistentes con los valores previamente publicados (Tam y colaboradores, 1998).

En las Tablas 2-3 se muestra un resumen de los resultados de ligamento.

Tabla 2. Resumen de afinidades GenO.95 y ReoPro a integrins purificados

	Placa recubierta con $\alpha_v\beta_3$ (n=6)	Placa recubierta con $\alpha_v\beta_5$ (n=6)
	Kd (M)	Kd (M)
GenO.95	$2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$	$2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$
ReoPro	$2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$	Insignificante

Tabla 3. Resumen de afinidades a células GenO.95 y ReoPro

	Células A375S2	Células A375S2	Células HT-29	Células HT-29	Células M21	Células M21
	Kd (M)	Receptores por célula	Kd (M)	Receptores por célula	Kd (M)	Receptores por célula
GenO.95	$5,2 \pm 2,04 \times 10^{-8}$ (n = 5)	120.000 ± 37.000 (n=7)	$1,3 \pm 0,38 \times 10^{-8}$ (n = 5)	81.000 ± 24.000 (n=7)	$8,5 \pm 3,03 \times 10^{-8}$ (n = 4)	200.000 ± 80.000 (n=8)
ReoPro	$22 \pm 3,7 \times 10^{-8}$	370.000 ± 190.000 (n=6)	Despreciable (n=4)	Despreciable (n = 4)	$10 \pm 2,00 \times 10^{-8}$ (n = 3)	660.000 ± 120.000 (n=7)
Anti $\alpha_v\beta_3$ LM609	nd	300.000 (n=2)	nd	nd	nd	nd
y $\alpha_v\beta_5$.	nd	70.000 ± 50.000 (n=4)	nd	73.000 (n=1)	Nd	44.000 (n=2)

Varias observaciones fueron de atención especial en las

5 caracterizaciones de conexiones. Los valores de afinidad (Kd) del GenO.95

sobre $\alpha_v\beta_5$ fueron más bajos que sobre y $\alpha_v\beta_3$. Valores inferiores de Kd

indican una afinidad más elevada; de estamanagera la afinidad por la unión

GenO.95 al integrin purificado $\alpha_v\beta_5$ fue aproximadamente de 8-veces más

elevadas que la conexión a $\alpha_v\beta_3$ de integrin purificado. No obstante, cuando

10 tanto los receptores de integrin están presentes sobre las mismas células, el

valor general de la afinidad de aproxima más estrechamente al valor

correspondiente al integrin que está en mayor abundancia. De esta manera

de la conexión GenO.95 con estas células fue similar a la afinidad sobre $\alpha_v\beta_3$. $\sim 7 \times 10^{-9}$ M. En contraposición, sobre células HT-29 las cuales expresan $\alpha_v\beta_5$, la afinidad GenO.95 fue ligeramente más elevada, 1×10^{-8} M. La discrepancia aproximadamente de 2-veces en sitios receptores por célula entre GenO.95 y la conexión ReoPro puede ser explicada por la diferencia en la valencia del anticuerpo. El GenO.95 (IgG) es bivalente y probablemente enlaza dos receptores adyacentes, en tanto que ReoPro (Fab) es monovalente y puede unir solamente un receptor (BRD930001).

10 REFERENCIAS

Fraker DJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,5-tetrachloro-3a-diphenyl-glycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.* 80:849, 1978.

15 Motulsky H. *Analyzing Data with GraphPad Prism*. GraphPad Software Inc. San Diego, CA 1999.

Tam SH, Sassoli PM, Rjordan, MT Nakada. *Circulation*, 1999.

20 Ejemplo 4: Efecto de anticuerpo de Integrin dual sobre modulación de angiogénesis

Resumen

El GenO95 es un anticuerpo monoclonal IgG1k que reconoce los

sobrevivencia y proliferación de células endoteliales, procesos que son importantes para la angiogénesis. El brote de células endoteliales imita la angiogénesis *in vitro* puesto que esta indica adhesión, migración, proliferación, y supervivencia de células. Utilizamos el ensayo de germinación para determinar si el GenO95 podría inhibir la función de $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$. Este ejemplo escribe que el GenO95 es un inhibidor de germinación de las células endoteliales

son cultivados en tres matrices de fibrina dimensionales, demostrando por este medio que este anticuerpo puede tener propiedades potenciales anti-angiogénicas.

Introducción

Existe ahora considerable evidencia de que desarrollo progresivo de tumores es dependiente de angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos. Dichos vasos sanguíneos proveen los tumores de nutrientes y oxígeno, retiran productos de desecho y actúan como conductos para la metástasis de células tumorales hacia sitios distantes (1). Estudios recientes han definido adicionalmente varios papeles de integrins en el proceso angiogénico. Los integrins son proteínas heterodiméricas de transmembrana que desempeñan un papel importante en adhesión de células de transmisión, migración, supervivencia y proliferación (2). La expresión de integrin $\alpha v \beta 3$ es mínima sobre vasos sanguíneos latentes o normales pero

angiogénicas (1-3). El integrin $\alpha\beta 5$ estrechamente relacionado pero distinto también ha sido revelado para mediar el proceso angiogenético. Un anticuerpo generado contra $\alpha\beta 3$ bloqueó factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF) inducido por angiogénesis, en tanto que un
5 anticuerpo específico para $\alpha\beta 5$ inhibió factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) indujo angiogénesis (1-5).

Angiogénesis puede ser imitada in vitro mediante un ensayo germinante endotelial. Este sistema implica migración y proliferación de
10 células endoteliales. El GenO95 es un anticuerpo monoclonal humano que reconoce integrins $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, y estos integrins regulan migración y proliferación de células endoteliales. Por lo tanto, determinamos si el GenO95 podría inhibir germinación de células endoteliales. Este ejemplo describe experimentos que demuestran que el GenO95 inhibe germinación
15 de células endoteliales humanas que se desarrollan en una matriz de fibrina.

Materiales

El factor de crecimiento de fibroblasto básico humano (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular humano 165 (VEGF₁₆₅) fueron
20 obtenidos de R&D Systems (Minneapolis, MN). MAB 1976Z (LM609), un anticuerpo monoclonal contra integrin $\alpha\beta 3$ y MAB1961 (PIF6), un anticuerpo monoclonal contra integrin $\alpha\beta 5$ fueron comprados de Chemicon (Temecula, CA). ReoPro y GenO95 fueron obtenidos de Centocor's Clinical

(libre de plasminógeno, >95% de proteína coagulable) y gelatina de piel bovina fueron comprados de Sigma (Saint Louis, MI).

Líneas celulares

- 5 Células endoteliales de vena umbilical humana, Huvecs, fueron compradas de Clonetics (Walkersville, MA). Las células huvecs fueron cultivadas en estuche (EBM) de medios basales endoteliales (Clonetics) que contenían 10% de FBS, factor-1 de crecimiento similar a R insulina larga, ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento epidermal humano,
- 10 factor de crecimiento endotelial vascular humano, hFGF-b, sulfato de gentamicina, y amfotericina-B. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ y el medio fue cambiado cada 2 a 3 días. Solamente los pasajes 3 a 8 fueron usados en todos los experimentos.

15 Ensayo de germinación basado en Microportador de Fibrina

- Una modificación de los métodos de Nehls y Drenckhahn (6) fue usada para medir la formación de tubo capilar en una matriz de tres dimensiones basada en fibrina. Microportadores recubiertos con gelatina cytodex-3 (MCs, Sigma) fueron preparados de acuerdo con las
- 20 recomendaciones del proveedor. MCs de autoclave frescos fueron suspendidos en EBM-2 ± 20% de FBS y las células endoteliales fueron adicionadas para una concentración final de 40 células/MC. Las células fueron dejadas adjuntarse a los MCs durante un período de incubación de 4

CO₂. MCs fueron ocasionalmente agitados para prevenir agregación de las perlas recubiertas por células. MCs fueron embebidos en un gel de fibrina que fue preparado como sigue: fibrinógeno humano (2 mg/ml) fue disuelto en un medio sencillo, bFGF o suero que contenía EBM-2. Esta solución también
5 contiene varios anticuerpos. Para prevenir el exceso de fibrinolisis por células embebidas en fibrina, se agregó aprotinina a la solución de fibrógeno y al medio de desarrollo a 200 U/ml. Se agregaron microportadores recubiertos con células a la solución de fibrinógeno a una densidad de 100 a 200 MCs/ml (50-100 bolitas/pozo – 48 pozos por placa) y la formación de
10 coágulos fue inducida por adición de trombina (0,5 U/ml). Después de que la formación de grumos fue completa, se agregaron 0,5 ml de solución (que contenía todos los componentes descritos anteriormente excepto fibrinógeno y trombina) a las matrices de fibrina. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante 1 a 3 días. Después de 1-3 días, geles fueron fijados con
15 3% de paraformaldehído disuelto en PBS, y el número de brotes de capilares con longitud que supera al diámetro de la perla de MC (150 µm) fue cuantificado.

Resultados y Discusión

20 Huvecs pueden formar brotes similares a capilares al cultivarse en un gel de fibrina (Figura 9). Células endoteliales migran hacia afuera de las perlas recubiertas con gelatina y se extienden en largos filopodios. Los retoños largos están formados por varias células que forman un lumen. Este

cuantificación de formación de brotes revela que el GenO95 inhibió formación de brotes de células endoteliales en bFGF o medios completos (Figura 10). La combinación de LM609 y P1F6 inhibió de manera rutinaria formación de brotes más efectivamente que el GenO95 (Figura 11).

5

Conclusión

La formación de nuevos vasos de sangre a partir de vasos de sangre existentes es un distintivo de angiogénesis. Este proceso puede ser imitado in vitro mediante el ensayo de formación de brote endotelial. Estos brotes
10 representan microcapilares que son formados en respuesta a estímulos angiogénicos tales como bFGF o una variedad de estímulos que están presentes en el suero. La dosis de GenO95 inhibe dependientemente bFGF – y formación de brotes de células endoteliales estimulados de medios completos, sugiriendo que este anticuerpo puede inhibir de manera efectiva
15 la función $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. El porqué el GenO95 no fue tan efectivo como la combinación de LM609 y P1F6 no es conocido, pero es posible que GenO95 reconozca $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ con afinidad inferior al compararse con LM609 y P1F6, respectivamente. Colectivamente, estos datos demuestran que el GenO95 puede inhibir el proceso complejo de formación in vitro de
20 microcapilaridad.

Referencias

1. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E,

2. Elliceiri BP, y Cheresch DA. 1999. The role of αV integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of actino and clinical development. The Journal of Clinical Investigation 103:1227-1230.
- 5 3. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, 1994. Integrin $\alpha V \beta 3$ antagonists promote tumor regresión by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 79: 1157-1164.
- 10 4. Enenstein J, Walweh NS, y Kramer RH. 1992. Basic FGF y TGF- β differentially modulate integrin expresión of human microvascular endotelial cells. Exp. Cell Res. 203:499-503.
- 15 5. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Vamer JA, y Cheresch DA. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct αV integrins. Science 270:1500-1502.
- 20 6. Nehls, V y Drenckhahm D. 1995. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. Microvascular Res. 50:311-322.

Ejemplo 5: Efecto de anticuerpo dual Integrín sobre adhesión a célula de tumor y endotelial, migración e invasión.

Ratones híbridos F₂ (1-4) (CBA/J x C57/BL6/J) que contenía variable humana y transgenes de anticuerpo de región constante para cadenas tanto pesadas como livianas fueron inmunizados con α V β 3 placentar humana. Una fusión produjo un anticuerpo monoclonal IgG1k totalmente humano α V β 3 reactivo llamado GenO95. El anticuerpo totalmente humano se encontró ser reactivo a los integrines α V β 3 y α V β 5 (5). Estos integrines participan en la adición de células endoteliales y de tumor, migración, e invasión. Por lo tanto, caracterizamos el efecto de GenO95 sobre movilidad de células intervenida por integrin. GenO95 inhibe melanoma endotelial de vena humana umbilical (HUVEC) y humano de células que se unen a vitronectin, colágeno desnaturalizado, fibrógeno y fibrina, pero no bloquea la adhesión de células a fibronectina y colágeno del tipo I. El GenO95 también inhibe migración de células endoteliales que han sido estimuladas con factor de crecimiento de fibroblasto básico y suero de baja dosis. El GenO95 inhibe invasión de células tumorales a través de un gel de fibrina. En conclusión, el GenO95 bloquea funcionalmente el α V β 3 y el α V β 5 en una variedad de ensayos basados en células *in vitro*.

Abreviaturas

- BSA – albúmina de suero bovino
- CO₂ – dióxido de carbono
- DMSO – dimetilsulfóxido
- FBS – Suero de feto bovino

Mab – Anticuerpo monoclonal

OD – Densidad óptica

RT – Temperatura ambiente

HUVECS – Células endoteliales de vena umbilical humanas

5 bFGF – Factor de crecimiento de fibroblasto bovino básico

Introducción

Existe ahora considerable evidencia de que el desarrollo de tumor progresivo es dependiente de la angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos proporciona el tumor con nutrientes y oxígeno, retira
10 productos de desperdicio y actúa como conductos para la propagación de células de tumor hacia sitios distantes. Varios estudios han definido el papel de integrins en el proceso angiogénico. Integrins son proteínas heterodinámicas de trans-membrana que desempeñan un papel crítico en la adhesión de células a la matriz extra celular (ECM) y actúa como mediador
15 en la supervivencia de células, su proliferación y migración (6). Durante el proceso angiogénico, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ son regulados con ventaja sobre la superficie de células endoteliales activadas, las cuales a su vez ayudan a estas células a migrar y proliferarse (6). Un anticuerpo generado contra $\alpha V\beta 3$ bloquea la angiogénesis inducida por factor de crecimiento (bFGF) de
20 fibroblasto básico, en tanto que, un anticuerpo específico para $\alpha V\beta 5$ inhibe el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) de angiogénesis inducida (6,7). Además de la angiogénesis reguladora, el $\alpha V\beta 5$ y $\alpha V\beta 3$ regulan adhesión de células de tumor, migración e invasión, procedimientos

que el GenO95 se une a integrins $\alpha V\beta 5$ y $\alpha V\beta 3$ purificados, por lo tanto, nosotros determinamos si este anticuerpo podría bloquear funcionalmente adhesión, migración e invasión de células de tumor y endoteliales intervenidas por $\alpha V\beta 3$ - y $\alpha V\beta 5$, de migración y adhesión.

5

Materiales y métodos

Materiales

Factor de crecimiento de fibroblasto bovino (bFGF) y factor de crecimiento endotelial vascular humano 165 (VEGF₁₆₅) fueron obtenidos de R&D Systems (Minneapolis, MN). MAB 1976Z (LM609), un anticuerpo monoclonal contra integrin $\alpha V\beta 3$ y MAB1961 (PIF6), un anticuerpo monoclonal contra integrin $\alpha V\beta 5$ fueron comprados a Chemicon (Temecula, CA). ReoPro (lote: 94A04ZE) y GenO95 (lote: JG100899) fueron obtenidos de Centocor. Insertos de cultivo de células BIOCOAT (tamaño de poro: 8 μm) fueron comprados a Becton Dickinson (Bedford, MA). Equipo de ensayo de adhesión de células VybrantTM (V-13181) fue comprado a Molecular Probes (Eugene, OR). Fibrógeno libre de plasminógeno humano (VWF/Fn agotado) fue comprado a Enzyme Research Labs (South Bend, IN). Gelatina de piel bovina fue comprada de Sigma (Saint Louis, MO). Vitronectina humana fue comprada de Promega (Madison, WI), y colágeno tipo I fue comprado de GIBCO (Gaithersburg, MD).

Líneas celulares

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECS), fueron compradas a Clonetics (Walkersville, MA), y fueron cultivadas en estuche de medio EBM (Clonetics) que contenía FBS al 10%, factor-1 de crecimiento similar a insulina R larga, ácido ascórbico, hidrocloruro de dexametasona, factor de crecimiento epidermal humano, factor de crecimiento endotelial vascular humano, sulfato de gentamicina y anfotericina-B. Las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ y el medio fue cambiado cada dos a tres días. Las células fueron intercambiadas cuando alcanzaron 80% de confluencia. Los pasajes 3 a 8 fueron utilizados en todos los experimentos.

10

La línea celular de melanoma humano A375S.2 que expresa los integrins $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ fue obtenida de Centocor Cell Bank en donde la línea celular fue considerada libre de micoplasma y contaminantes bacteriales. Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 2mM L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales.

15

Células HT29 de carcinoma de colon humano fueron obtenidas de Centocor Cell Biology Service Department, en donde la línea celular fue considerada libre de micoplasma y contaminación bacteriana. Las células fueron cultivadas en un medio α -MEM suplementado con FBS al 10%, 2 mM L-glutamina, y 1mM piruvato de sodio, y 0,1 mM aminoácidos no esenciales.

20

Para la detección de integrins superficiales, las células fueron cosechadas, enjuagadas, suspendidas en medios suplementados con RPMI, e incubados secuencialmente durante 60 minutos sobre hielo con anti integrin mAb (10 μ g/ml) y anticuerpo de anti-ratón, FICT-rotulado de cabra, ó anticuerpo de anti-integrin rotulado FITC (10 μ g/ml). La ausencia de anticuerpo primario o sustitución de anticuerpo primario con isótopo apareado con anticuerpo sirvió como controles negativos. Las células fueron inmediatamente analizadas con un citómetro de flujo de Scan II de FACS (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

10

Ensayo de adhesión

Placas de microtítulo (Linbro-Titertek, ICN Biomedicals, Inc) fueron recubiertas a 4°C durante la noche con vitronectina (1 μ g/ml), gelatina (0,1%), fibrinógeno (100 μ g/ml), colágeno tipo I (10 μ g/ml), o fibronectina (10 μ g/ml). Inmediatamente antes de uso, las placas fueron enjuagas con PBS y bloqueadas durante 1 hora con BSA/PBS al 1% (pH 7.4). Pozos mitrotitulados recubiertos con fibrina fueron formados mediante tratamiento con trombina (1 U/ml) de fibrinógeno. Células adherentes (HUVECS HT29 y A375S.2) fueron rotuladas con colorante (Molecular Probes, Eugene, OR) fluorescente AM de acuerdo con las instrucciones del fabricante, cosechadas, lavadas dos veces, y suspendidas en 0,1% de BSA en medio de DMEM. Después de que la densidad de las células fue ajustada hasta 5×10^5 /ml, las células fueron incubadas con varias concentraciones de

20

agregada a pozos (100 μ l por pozo) e incubados durante 1 h a 37°C. Las placas fueron enjuagadas dos veces con PBS para retirar células no unidas y la adhesión fue medida en un lector fluorescente de placas (Fluoroskan) a 485-538 nm. La adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. Anticuerpos enfrentados con isotipo sirvieron como un control negativo.

Ensayo de Migración Quimiotáctica

Se llevaron a cabo ensayos de migración de células en cámaras 24-Transpodos con una membrana de poliestireno (6,5 mm de diámetro, 10 μ m de espesor, y un tamaño de poro de 8 μ m). Cultivos de células de 24-hr subconfluentes (HUVECS o A375S.2) fueron cosechados con tripsina-EDTA, lavados dos veces, y vueltos a suspender en su respectivo suero libre de medio que contenga 0,1% de BSA. Células (100.000/500 μ l) fueron agregadas a la cámara superior en presencia o en ausencia de anticuerpos.

Para facilitar migración quimiotáctica de células, se añadieron 750 μ l de medio que contenía 0,1% de BSA y vitronectina (2 μ g/ml) o suero (2% para HUVECS y 10% para células A375S2) a las cámaras de fondo y la placa fue colocada en un incubador de cultivo de tejido. La migración fue terminada después de 4 a 8 horas mediante remoción de las células sobre la parte superior con un estropajo de algodón y luego los filtros fueron fijados con 3% de paraformaldehído y manchados con Cristal Violeta. El grado de migración de células fue determinado mediante microscopía con luz y las imágenes fueron analizadas utilizando programa de computador de análisis de 3 fases

por las células manchadas en el lado inferior del filtro y este es directamente proporcional al grado de migración de células.

Ensayo de migración haptotático

- 5 Se llevaron a cabo ensayos de migración de células utilizando las cámaras de transpozó según se describió anteriormente con leves modificaciones. Brevemente, el lado inferior de la membrana fue recubierto con vitronectina (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 60 minutos a temperatura ambiente, y luego se bloqueó con una solución de BSA/PBS al 1% a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego, las membranas fueron lavadas con PBS y secadas al aire. Suero libre de sodio (750 μl) que contenía 0,1% de BSA y bFGF (20 ng/ml) fue agregado a las cámaras inferiores. Los cultivos sub-confluentes 24 horas fueron cosechados con tripsina-EDTA, lavados dos veces, y vueltos a suspender en suero libre de sodio. Las células
- 10 (100.000/500 μl) fueron agregadas a las cámaras superiores en presencia o ausencia de anticuerpos. Las cámaras fueron colocadas en un incubador de cultivo de tejido y se dejó proceder la migración durante 6 horas. El grado de migración de células fue determinado según se describió anteriormente.

20 Ensayo de Invasión

Fibrinógeno (Libre de plasminogen, 100 μl de 10 mg/ml) y 100 μl de 1 U/ml de trombina fueron mezclados e inmediatamente agregados a la cámara superior de placas de transpozó de 24 pozos (6,5 mm de diámetro,

fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos para formar un gel de fibrina. Células de tumor confluentes (A375S.2) fueron tripsinizadas, centrifugadas, suspendidas nuevamente en medio basal suplementado con 0,1% de BSA y 10 µg/ml de plasminogen (Enzyme research Labs, Suth Bend, IN) con varias

5 concentraciones de anticuerpos, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Células (100.000/500 µl) fueron agregadas a la cámara superior en presencia o en ausencia de anticuerpos. El compartimiento inferior de la cámara de invasión fue llenado con 0,75 ml de FBS-DMEM al 10%, el cual sirvió como un atractivo químico y la placa fue

10 transferida a un incubador de cultivo de tejido. Después de 24 horas, la invasión fue terminada retirando las células sobre la parte superior con un estropajo de algodón, y los filtros fueron fijadas con, para formaldehído al 3% y teñidos con Cristal Violeta. El grado de migración de células fue analizado utilizando el programa de computador de análisis de imagen de 3 fases

15 según se describió anteriormente.

Resultados y discusiones

El Gen095 inhibe adhesión de células intervenida por $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$

20 Puesto que Gen095 se liga a integrines $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, hemos determinados si nuestras células de tumor (A375S.2 y HT29) y células endoteliales expresan estos integrins. La citometría de flujo indicó que las células A375S.2 y HUVEC expresan integrines tanto $\alpha V\beta 3$ como $\alpha V\beta 5$, pero

las células HT29 expresan integrin $\alpha V\beta 3$ pero no expresan integrin $\alpha V\beta 3$ (Figura 12A-I).

Células HT29 (12A, B y C) expresan integrin $\alpha V\beta 5$, pero no $\alpha V\beta 3$
5 sobre su superficie. Células HUVEC (12D, E y F) y A375S.2 (12G, H e I) expresan integrins $\alpha V\beta 5$ y integrins $\alpha V\beta 3$ en su superficie. Las células tumorales y las células endoteliales fueron manchadas por inmunofluorescencia y analizadas por citometría de flujo. El histograma en el lado izquierdo representa fluorescencia de fondo en presencia de isotipo que
10 corresponde al anticuerpo. El histograma en el lado derecho indica coloramiento positivo. A, D, G, LM609 (mAb con dirección a $\alpha V\beta 3$, 10 $\mu\text{g/ml}$); y B, E, H, PIF6 (mAb dirigido a $\alpha V\beta 5$, 10 $\mu\text{g/ml}$); y C, F, I, GenO95 (10 $\mu\text{g/ml}$).

15 El efecto del GenO95 sobre adhesión de HUVEC, A375S.2 y células HT29 a varias proteínas de matriz fue determinada en detalle. El GenO95 inhibe completamente la adhesión de células HUVEC y células A375S.2 a vitronectina, y parcialmente a fibrinógeno, gelatina y placas recubiertas con fibrina, indicando que el anticuerpo puede bloquear a $\alpha V\beta 3$ y a $\alpha V\beta 5$
20 (Figura 2 y 3, Tabla 1 y 2).

GenO95 inhibió completamente la adhesión a placas recubiertas con vitronectina, indicando que el anticuerpo bloquea el $\alpha V\beta 5$ (Figura 4). El

placas recubiertas con vitronectina, indicando que el anticuerpo bloquea el $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ (Figuras 2 y 3). Los datos fueron graficados como porcentaje de inhibición máxima (ningún anticuerpo) y regresión no lineal llevada a cabo utilizando Graph Pad Prism.

5

Adhesión de HUVECS a placas recubiertas con proteínas de matriz. El ensayo de adhesión fue llevado a cabo según se describe en Métodos. La placa fue leída en un fluorómetro a 485 – 538 nm. La adhesión de células a pozos recubiertas con BSA sirvió como un control negativo. En la Figura 10 13, se representó gráficamente el grado de adhesión de células en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo, como un porcentaje de adhesión de células en ausencia de anticuerpo que fue considerado como 100%. Cada punto de datos es la media de determinaciones por triplicado (+/- SD).

15

Adhesión de células de melanoma humano a placas de matriz recubiertas con proteína. El ensayo de adhesión fue llevado a cabo según se describe en Métodos. La adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como un control negativo. En la Figura 14 fue representado 20 gráficamente el grado de adhesión de células en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo, como un porcentaje de adhesión de células en ausencia de anticuerpo que fue considerado como del 100%. Cada punto de datos es la media de determinaciones por triplicado (+/- SD).

Tabla 4. Adhesión de células HUVECs a vitronectina, gelatina, fibrinógeno, fibrina, fibronectina y colágeno Tipo I. El grado de adhesión de células en presencia de diferente concentración de anticuerpo fue representado gráficamente como un porcentaje de la adhesión de células en ausencia de anticuerpo que fue considerada como del 100%. Cada punto de datos es la media de determinaciones por triplicado (+/- SD). La concentración de anticuerpos usada es de 10 µg/ml.

	Adhesión (%) +/- SD					
	Vitronectina	Gelatina	Fibrinógeno	Fibrina	Fibronectina	Colágeno Tipo I
IgG humano	96,3 ± 11,4	109,0 ± 8,8	108,0 ± 6,3	99,7 ± 4,5	96,8 ± 4,7	99,3 ± 4,1
LM609	26,3 ± 3,7	36,5 ± 4,7	14,3 ± 2,5	48,1 ± 1,5	102,8 ± 7,2	108,8 ± 12,7
PIF6	39,8 ± 5,9	94,4 ± 15,1	94,5 ± 4,2	96,7 ± 4,5	103,2 ± 3,8	115,7 ± 8,1
LM609-PIF6	3,7 ± 0,4	32,2 ± 5,2	10,7 ± 1,1	30,7 ± 8,9	99,6 ± 4,7	116,2 ± 4,1
GenO95	3,3 ± 0,6	54,8 ± 4,0	34,5 ± 1,7	45,1 ± 2,4	101,6 ± 6,1	97,7 ± 3,9
ReoPro	54,9 ± 0,9	2,5 ± 2,3	8,7 ± 2,9	35,8 ± 3,0	96,3 ± 2,8	99,6 ± 6,0

10

Tabla 5. Adhesión de células A375S.2 a vitronectina, gelatina, fibrinógeno, fibrina, fibronectina y colágeno Tipo I. El grado de adhesión de células en presencia de diferente concentración de anticuerpo fue representado

anticuerpo que fue considerada como del 100%. Cada punto de datos es la media de determinaciones por triplicado (+/- SD). La concentración de anticuerpos usada es de 10 µg/ml.

5 Adhesión (%) +/- SD

	Vitronectina	Gelatina	Fibrinógeno	Fibrina	Fibronectina	Colágeno Tipo I
IgG	104,0 ± 5,3	94,6 ± 12,4	102,5 ± 5,9	99,5 ± 4,0	100,0 ± 5,5	99,1 ± 3,3
humano						
LM609	42,1 ± 6,1	25,2 ± 7,1	14,0 ± 1,8	50,0 ± 1,9	104,0 ± 8,1	100,0 ± 1,5
PIF6	28,5 ± 3,8	87,4 ± 7,8	99,4 ± 3,6	92,9 ± 4,7	101,0 ± 5,7	101,0 ± 7,3
LM609- PIF6	0,9 ± 0,3	1,1 ± 1,5	10,3 ± 2,6	47,6 ± 3,2	109,0 ± 4,1	102,0 ± 4,6
GenO95	1,4 ± 0,4	23,2 ± 7,2	11,4 ± 2,8	43,3 ± 3,5	103,0 ± 4,5	104,0 ± 5,9
ReoPro	38,1 ± 0,7	6,0 ± 1,0	6,5 ± 2,1	104,0 ± 5,6	104,0 ± 5,6	93,1 ± 3,1

Adhesión de células de colon humano HT29 de carcinoma a vitronectina. El ensayo de adhesión fue llevada a cabo según se describe en Métodos. La adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como un control negativo. Los datos en la Figura 15 son representados gráficamente con un porcentaje de adhesión máxima (ausencia de anticuerpo), y son la media de determinaciones por triplicado (+/- SD).

El GenO95 bloquea el melanoma humano y la migración de células endoteliales.

Integrins $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ participan en la migración de células, por lo tanto hemos determinados si GenO95 podría bloquear migración de células
5 estimuladas por vitronectina. La migración de células estimulada por vitronectina implica $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. La dosis GenO95 dependientemente inhibió migración de células endoteliales cuando se usó vitronectina como un quimioatractivo (Figuras 5 & 6). Interesantemente, el GenO95 también inhibió la migración de células tanto HUVECS y células A375S.2 hacia el
10 suero (Figuras 7-8). Estos hallazgos podrían ser potencialmente importantes para terapia tanto angiogenética como de tumor puesto que ellas sugieren que los objetivos para GenO95, $\alpha V\beta 3$, y $\alpha V\beta 5$, son receptores centrales que son activados por una variedad de factores migratorios que están presentes en el suero.

15

Migración de HUVECS hacia 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina. El ensayo fue llevado a cabo como se describió en Métodos y las células dejaron migrar durante 6 h. Fotomicrografías son campos representativos (lentes objetivo 10 x) de migración de células en la Figura 16A, ausencia de anticuerpo,
20 (16B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), (16C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$). La Figura 16D es una representación gráfica de la migración de células en la presencia de concentraciones variantes de GenO95. Los datos fueron normalizados a porcentaje control (sin anticuerpos) el cual se consideró como 100 %, y cada

Migración de HUVECS hacia 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina en presencia de anticuerpos hacia $\alpha\text{V}\beta 3$ y $\alpha\text{V}\beta 5$. El ensayo de migración fue llevado a cabo según se describió en Métodos, y se permitió que las células migraran durante 6 horas. LM609 y P1F6 son mAbs dirigidos a $\alpha\text{V}\beta 3$ y $\alpha\text{V}\beta 5$, respectivamente. Los datos ilustrados en la Figura 17 fueron normalizados hasta porcentaje de control (sin anticuerpos) lo cual fue considerado como 100%, y cada barra es la media de tres filtros de transpozo (+/- SD). BSA, IgG de ratón e IgG humano sirvieron como controles negativos. LM609-P1F6 representan combinaciones de ambos anticuerpos. Los anticuerpos y BSA fueron utilizados a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Migración de HUVECS hacia 2% de FBS. El ensayo de migración fue permitido para durar durante 4h y los datos fueron capturados según se describió en Métodos. La Figura 18(A) es una representación gráfica de migración de células en presencia de LM609, P1F6, combinación de LM609+P1F6, anticuerpos de control de isotipo duplicado (humanos y de ratón). Los anticuerpos y proteínas fueron utilizados a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 18(B) es una representación gráfica de la migración de células en presencia de ReoPro y GenO95. Fotomicrografías son campos representativos (lentes objetivo 10x) de migración de células en la Figura 18(C), la ausencia de anticuerpo, Figura 18(D), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), y la figura 18(E), GenO95 (20 $\mu\text{g/ml}$). Los datos fueron normalizados hasta porcentaje

de control (no anticuerpo) lo cual es considerado como 100%, y cada punto es la media de tres filtros de transpozo (+/- SD).

Migración de células A375S.2 hacia 10% de FBS. El ensayo de migración fue permitido proceder durante 4h y los datos fueron recogidos según se describió en Métodos. Anticuerpos fueron utilizados a una concentración de 10 µg/ml. La Figura 19(A) es una representación gráfica de migración de células en presencia de concentraciones variables de GenO95. La Figura 19(B) es una representación gráfica de migración de células en presencia de LM609, P1F6, combinación de LM609+P1F6, anticuerpos de control que se igualan isotipos (humanos y de ratón). Los datos fueron normalizados hasta porcentaje, de control, lo cual fue considerado como 100%, y cada punto es el término medio de tres filtros de transpozo (+/-SD). Fotomicrografías son campos representativos (lentes objetivos 10x) de migración de células en la Figura 19(C), ausencia de anticuerpo, Figura 19(D), GenO95 (5 µg/ml), y la Figura 19(E), GenO95 (20 µg/ml).

Los resultados descritos anteriormente indican que el GenO95 bloquea el tumor y migración endotelial hacia vitronectina y suero. Luego, determinamos si este anticuerpo podría inhibir migración de células estimulada por bFGF. Como se muestra en la Figura 9, la migración de células HUVEC estimulada por bFGF hacia vitronectina, y GenO95 significativamente bloqueó esta migración de células estimuladas.

Migración de HUVECS hacia vitronectina en presencia de bFGF. Los lados inferiores de filtros de cámaras de migración fueron recubiertos con 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina, y el ensayo fue llevado a cabo según se describió en Métodos. Se permitió que las células migraran durante 6 horas. En la Figura 20A-E, cada punto de dato es la media de 3 filtros de transpozo (+/- SD). La Figura 20(A), bFGF; la Figura 20(B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$); la Figura 20(C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$); la Figura 20(D), sin bFGF. La Figura 20(E), Inhibición de migración de células en presencia de diferentes anticuerpos es ilustrada gráficamente.

10

El GenO95 bloquea invasión de células de melanoma humano

Los resultados descritos anteriormente indican que los GenO95 pueden inhibir adhesión y migración de células. Por lo tanto, nosotros cuestionamos si este anticuerpo podría bloquear invasión de células tumorales, un proceso de etapas múltiples que implica adición de células, degradación de la matriz y migración de células a través de la matriz degradada. Seleccionamos fibrina como una matriz para células de tumor porque la GenO95 fue capaz de bloquear la adhesión de células de tumores a fibrina (Figura 3). Como se muestra en la Fig 10, la invasión de células A375S.2 podría ser inhibida mediante LM609, sugiriendo la implicación de al menos $\alpha\text{V}\beta 3$ en este proceso. La dosis de GenO95 dependientemente inhibió invasión de células tumorales a través de fibrina. Una irrelevante IgG y una mAb dirigida a la plaqueta GPIIb/IIIa (10E5) sirvieron como controles

20

negativo. Colectivamente, estos datos sugieren que GenO95 pueden bloquear efectivamente invasión de células de melanoma humano.

Invasión de células de A375S.2 a través de gel de fibrina (5 mg/ml).

- 5 Un ensayo de invasión fue permitido proceder durante 24 horas y los datos fueron capturados según se describió en Métodos. Fotomicrografías son representativas de campos (lentes objetivo 4x) de invasión de células en la Figura 21(A) la ausencia de anticuerpos, la Figura 21(B) GenO95 (10 μ g/ml), la Figura 21(C) y (D) son una representación gráfica de invasión de células
- 10 en presencia de GenO95, 10E5 F(ab')₂, LM609, P1F6, LM-P1F6 (LM609+P1F6), IgGs humano de y ratón (H-IgG y M-IgG). La Figura gráfica 21(D): la concentración de todos los anticuerpos y proteínas es 10 μ g/ml. Los datos fueron normalizados a porcentaje de control (sin anticuerpo) que fue considerado como 100%, y cada punto es la media de tres filtros de
- 15 transpozo (+/- SD).

Conclusión

- La adhesión, migración e invasión de células requiere integrins tales como α V β 3 y α V β 5. El GenO95 es capaz de bloquear funcionalmente α V β 3
- 20 y α V β 5 integrins que son expresadas por células endoteliales y de tumor. GenO95 fue capaz de bloquear migración e invasión de células que fueron estimuladas por bFGF o suero. Estos resultados sugieren que el GenO95 es un potente inhibidor de tumor y células endoteliales expresadas como

Referencias

1. Taylor, L.D., C.E. Carmack, D. Huszar, K.M. Higgins, R. Mashayekh, G. Sequer, S.R. Schramm, C-C. Kuo, S. L. O'Donnell, R. M. Kay, C. S. Woodhouse, and N. Lonberg. 1993. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *International Immunology* 6:579-591.
2. Lonberg, N., L. D. Taylor, F. A. Harding, M. Trownstine, K. M. Higgins, S. R. Schramm, C-C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J. G. McCabe, D. Munoz-O'Regan, S. L. O'Donnell, E. S. G. Lapachet. T. Bengoechea, D. M. Fishwild, C. E. Carmack, R. M. Kay, and D. Huszar. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distincy genetic modifications. *Nature* 368:856-859.
3. Neuberger, M. 1996. Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nature Biotechnology* 14:826.
4. Fishwil, D. M., S. L. O'Donnell. T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K.M. Higgins, S. R. Schramm, and N. Lonberg. 1996. High-avidity human IgG monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nature Biotechnology* 14:845-851.
5. Gastl, G., T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger, and A. Kraft. 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment.

6. Elicieri , B. P., and D. A. Cheresh . 1999. The role of $\alpha_5\beta_1$ integrins during angiogenesis : insights into potential mechanisms of action and clinical development. The Journal of Clinical Investigation 103: 1227-1230.
- 5 7. Fridlander M., P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Vamer, and D. A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct $\alpha_5\beta_1$ integrins. Science 270: 1500-1502.

Resultará claro que la invención puede ser practicada de otro modo
10 que el que particularmente se describe en la presente descripción y ejemplos.

Numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son
posibles a la luz de las enseñanzas anteriores, y por lo tanto se encuentran
15 dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

- 5 1. Por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero, que comprende por lo menos una región variable que comprende SEQ ID.No.: 7 u 8.
- 10 2. Un ácido nucleico aislado que codifica al menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que comprende por lo menos una región variables que comprende SEQ ID NO.: 7 u 8.
- 15 3. Una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 2.
- 15 4. Una composición que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual de mamífero aislado que tiene al menos una región variable que comprende SEQ ID No: 7 u 8, y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Un método de diagnóstico o tratamiento de una condición relacionada con integrin dual en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende
- (a) poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un anticuerpo

menos una región variable que comprende SEQ ID No.: 7 u
8, con, o a, dicha célula, tejido, órgano o animal.

- 5 6. Al menos un anticuerpo anti-dual integrin aislado de mamífero, que comprende ya sea (i) no menos de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) y secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1, 2, y 3; o (ii) no menos de la secuencias de aminoácidos CDR de cadena liviana de SEQ ID NOS: 4, 5, y 6.
- 10 7. Un ácido nucleico aislado que codifica al menos un anticuerpo anti-IL-12 de mamífero aislado ya sea (i) no menos de las secuencias de aminoácidos CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2, y 3; o (ii) no menos de las secuencias de aminoácidos CDR de cadena liviana
- 15 de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6.
8. Una células huésped procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucléico aislado de acuerdo con la reivindicación 7.
- 20 9. Una composición que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que tiene ya sea (i) todas las secuencias de los aminoácidos CDR de cadena pesada de SEQ ID No.: 1, 2 y 3; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos CDR de

10. Un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con integrin dual en una célula, tejido, órgano u animal, que comprende
- a) poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un anticuerpo de integrin anti-dual de mamífero aislado que tiene ya sea (i) todas las secuencias del aminoácido CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos CDR de cadena liviana de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, con o para, dicha célula, tejido, órgano o animal.
11. Por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero, que tiene por lo menos una cadena pesado o liviana CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos uno de SED ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.
12. Un ácido nucleico aislado que codifica por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual de mamífero aislado que tiene al menos una cadena pesada o cadena liviana de CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos uno de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.
13. una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 12.

14. Una composición que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual que tiene por lo menos una cadena pesada o cadena liviana de CDR que tiene la secuencia de aminoácido de por lo menos uno de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15. Un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con dual integrin en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende

a. poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que tiene por lo menos una cadena liviana o cadena pesada CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6, con, o para, dicha célula, tejido, órgano o animal.

16. Por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que se liga a la misma región que una proteína integrin dual como un anticuerpo que comprende por lo menos una cadena pesada o una cadena liviana CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6.

17. Un ácido nucleico aislado que codifica al menos un anticuerpo integrin

menos una cadena pesada o cadena liviana CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos uno de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

- 5 18. Una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 17.
- 10 19. Una composición que comprende al menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que se une a la misma región que una proteína integrin dual como un anticuerpo que comprende al menos una cadena pesada o cadena liviana CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos uno de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6, y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 20. Un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con integrin dual, en una célula, tejido, órgano o animal que comprende
- 20 a. poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un anticuerpo de integrin anti-dual de mamífero aislado que se une a la misma región de una proteína de integrin dual como un anticuerpo que comprende por lo menos una cadena pesada o una cadena liviana CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una de los SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5,

21. Por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero, que comprende por lo menos CDR humano, en donde dicho anticuerpo específicamente se une a por lo menos un epítoto que comprende por lo menos 1-3, a la secuencia de aminoácidos entero

5 SEQ ID NO: 9.

22. Un ácido nucleico aislado que codifica por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que tiene por lo menos un CDR humano, en donde dicho anticuerpo específicamente se une a al

10 menos un epítoto que comprende al menos 1-3, de la secuencia de aminoácidos entera de SEQ ID NO: 9.

23. Una célula huésped procariótica o eucariótica comprendiendo un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 22.

15

24. Una composición que comprende por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual de mamífero aislado que tiene por lo menos un CDR humano, en donde dicho anticuerpo específicamente une al menos un epítoto que comprende por lo menos 1-3, a la secuencia completa de

20 aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y por lo menos un portador y diluyente farmacéuticamente aceptable.

25. Un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con

a. poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un anticuerpo integrin anti-dual aislado de mamífero que tiene por lo menos un CDR humano, en donde dicho anticuerpo específicamente se une a por lo menos un epítoto que comprende al menos 1-3, de la secuencia de aminoácidos entera de SEQ ID NO: 9, con, o para, dicha célula, tejido, órgano o animal.

10 26. Cualquier invención aquí descrita.

15

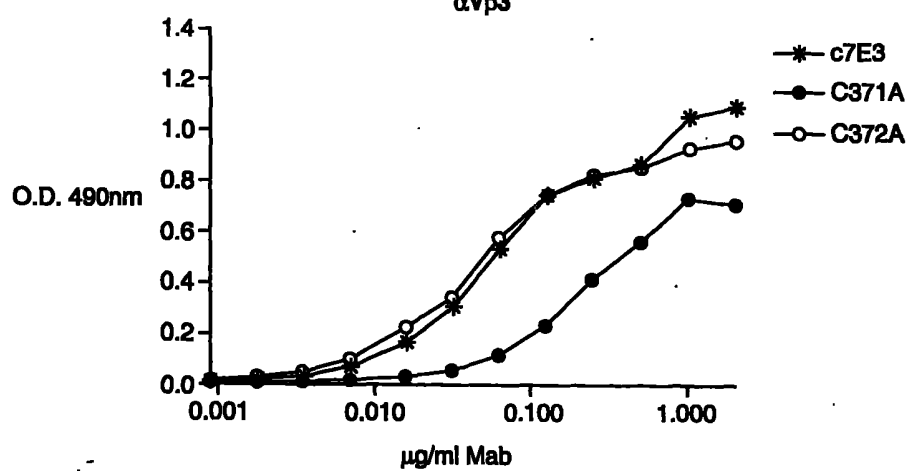
20

Abstracto:

La presente invención se relaciona con al menos anticuerpos integrin anti-dual, que incluyen ácidos nucleicos aislados que codifican al menos un
5 anticuerpo integrin anti-dual; integrin dual, vectores, células huésped, animales transgénicos o plantas y métodos de hacer y usar los mismos, incluyendo composiciones terapéuticas, métodos y dispositivos.

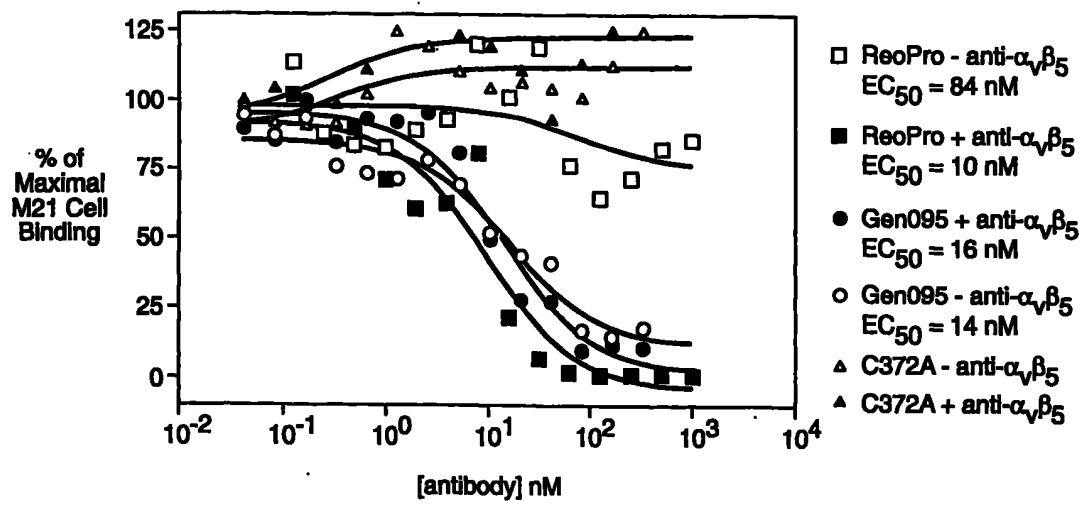
FIG. 1

Binding of GenPharm Mabs to $\alpha V\beta 3$



1/30

FIG. 2

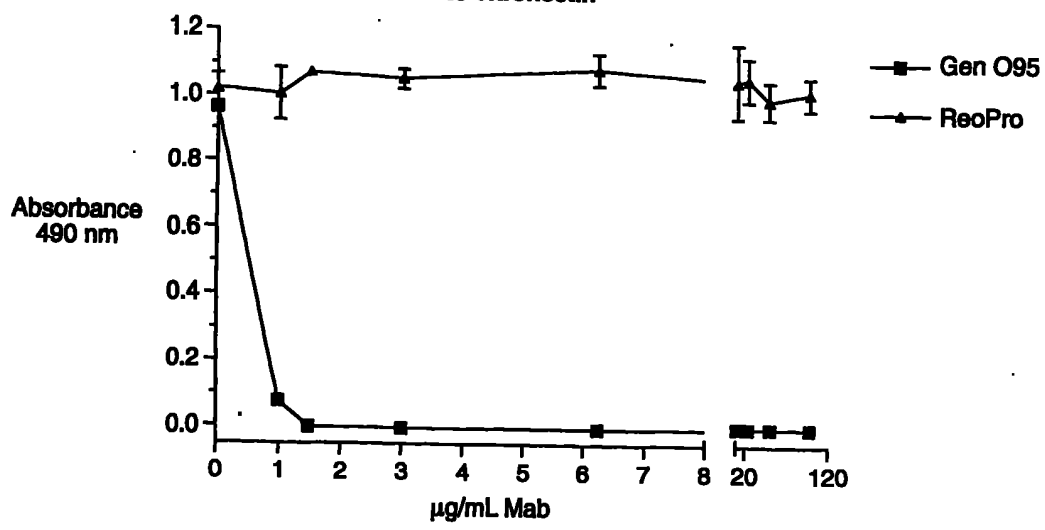


2/30

3/30

FIG. 3

**Adhesion of human Breast
Carcinoma MDAMB435L2 cells
to vitronectin**



4/30

FIG. 4A

Binding of $\alpha V\beta 3$ to GenO95
Plate in presence of 50 mM
EDTA (no Ca^{++}) or with Ca^{++}
alone

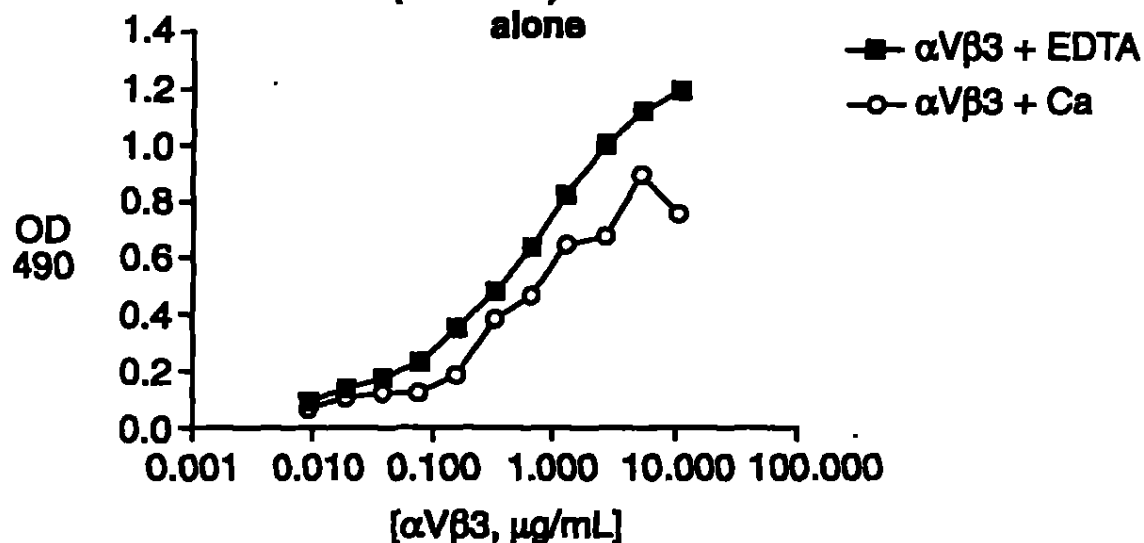
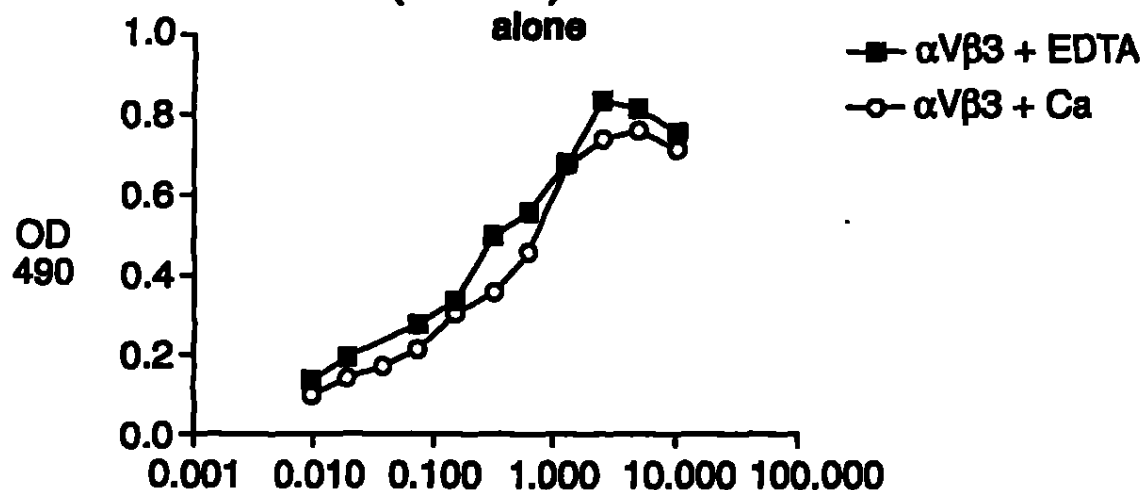


FIG. 4B

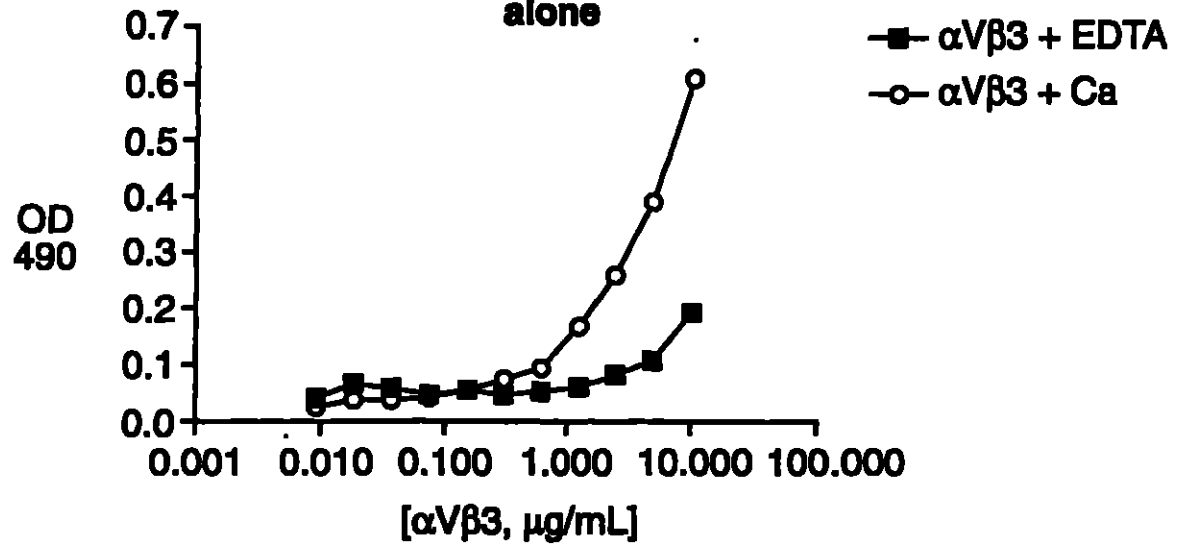
Binding of $\alpha V\beta 3$ to C372A
Plate in presence of 50 mM
EDTA (no Ca^{++}) or with Ca^{++}
alone



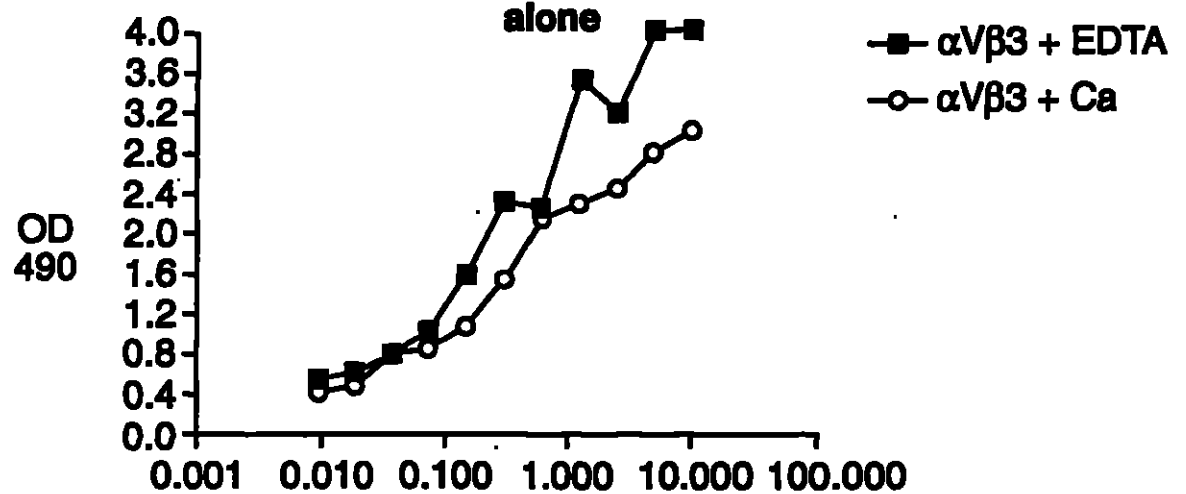
5/30

FIG. 4C

Binding of $\alpha V\beta 3$ to c7E3 IgG
Plate in presence of 50 mM
EDTA (no Ca^{++}) or with Ca^{++}
alone

**FIG. 4D**

Binding of $\alpha V\beta 3$ to LM609 IgG
Plate in presence of 50 mM
EDTA (no Ca^{++}) or with Ca^{++}
alone



6/30

FIG. 4E

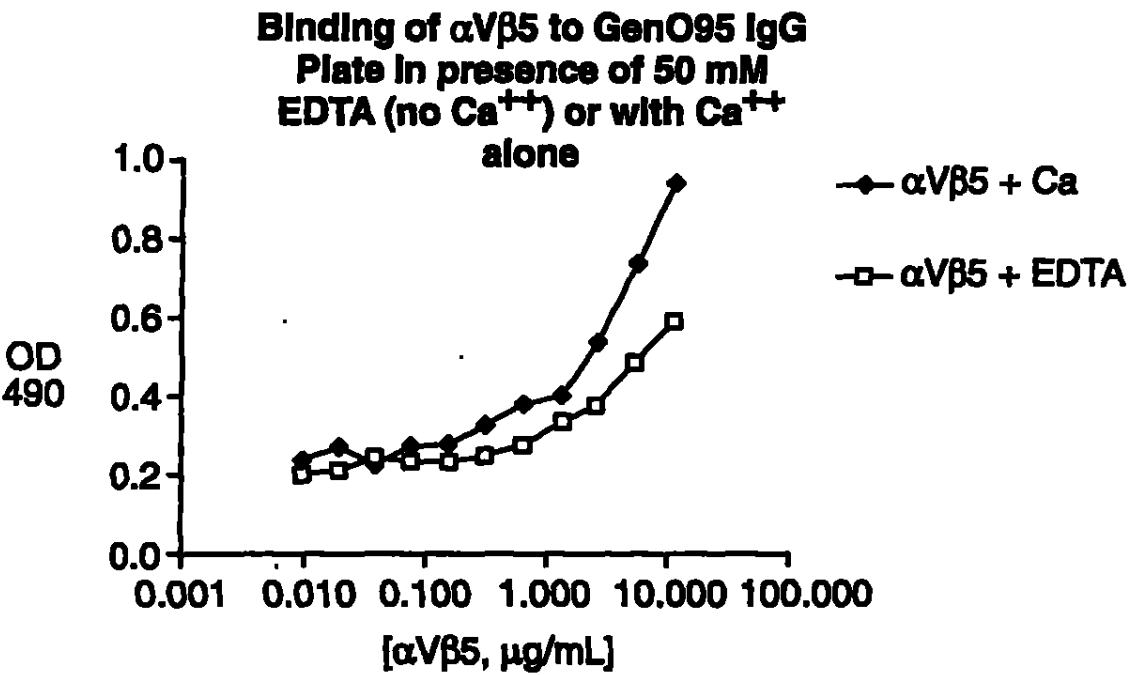
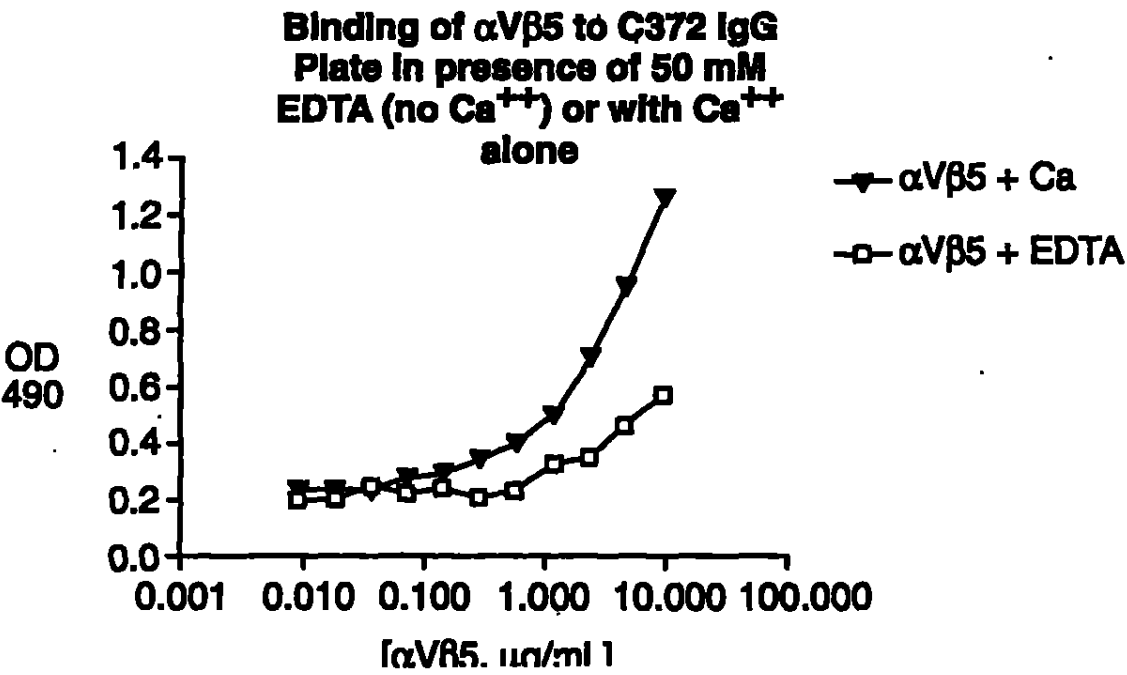


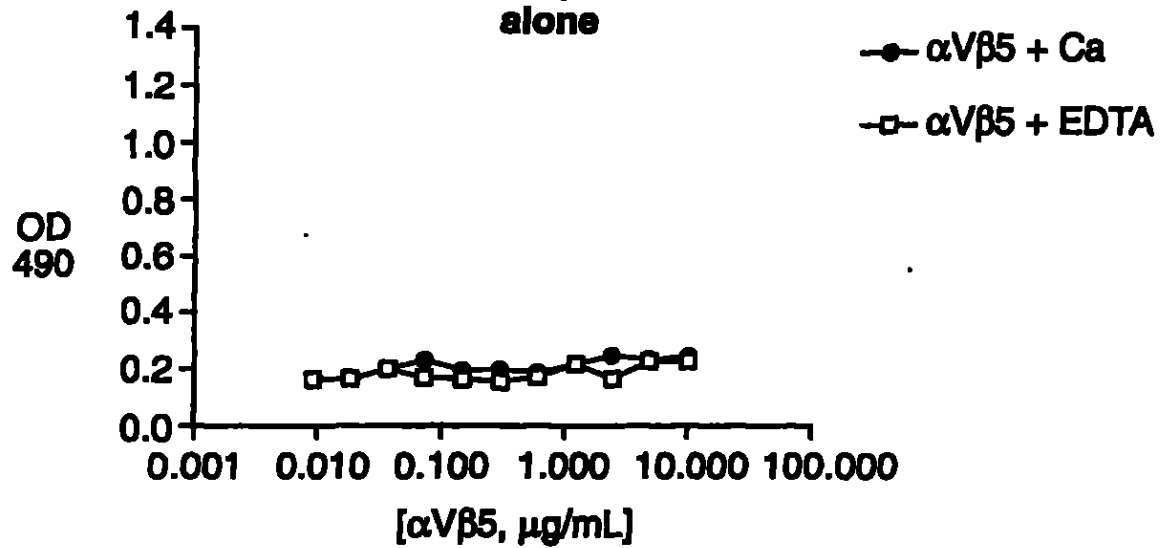
FIG. 4F



7/30

FIG. 4G

Binding of $\alpha V\beta 5$ to c7E3 IgG
Plate in presence of 50 mM
EDTA (no Ca^{++}) or with Ca^{++}
alone



8/30

FIG. 5A

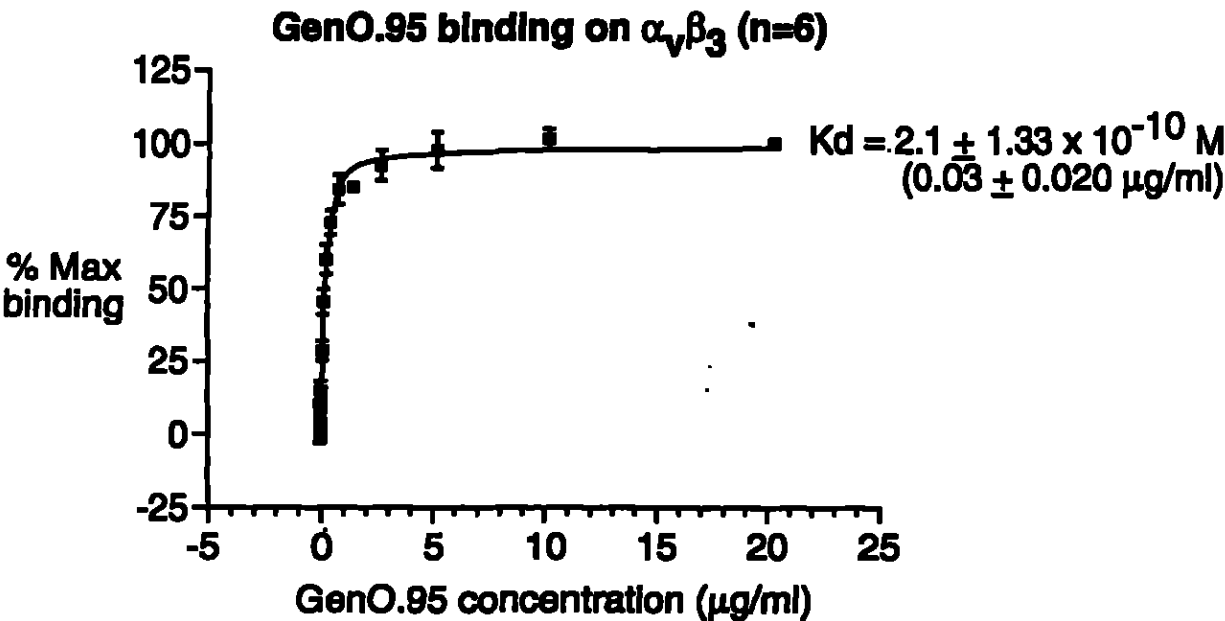
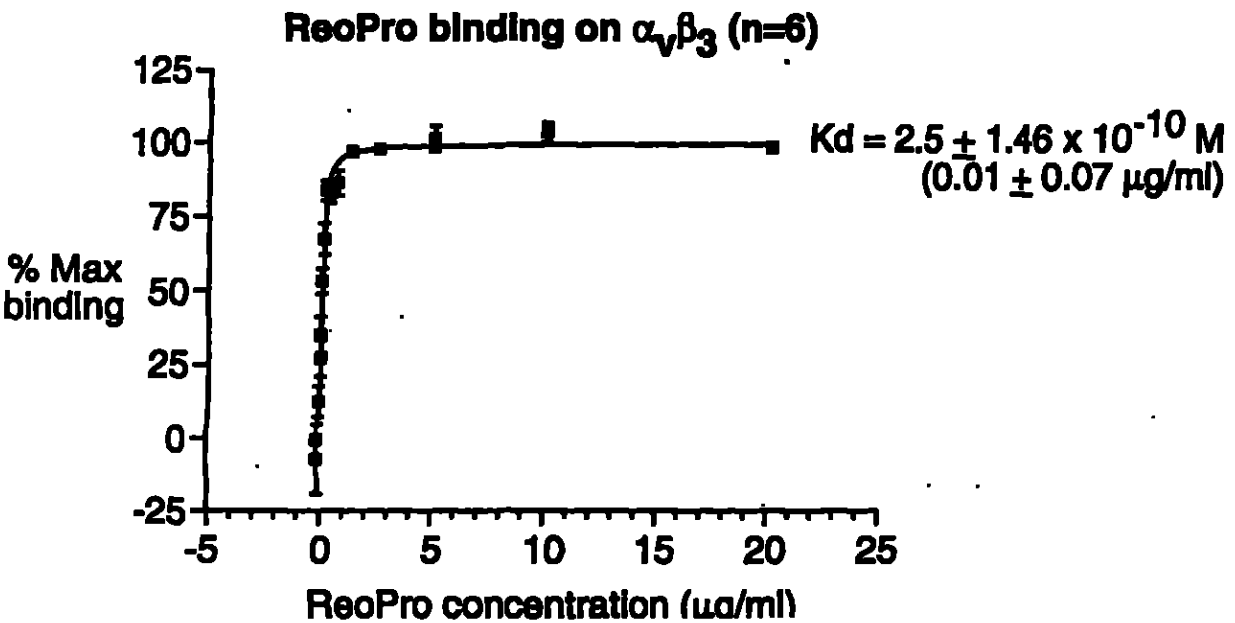


FIG. 5B



9/30

FIG. 6A

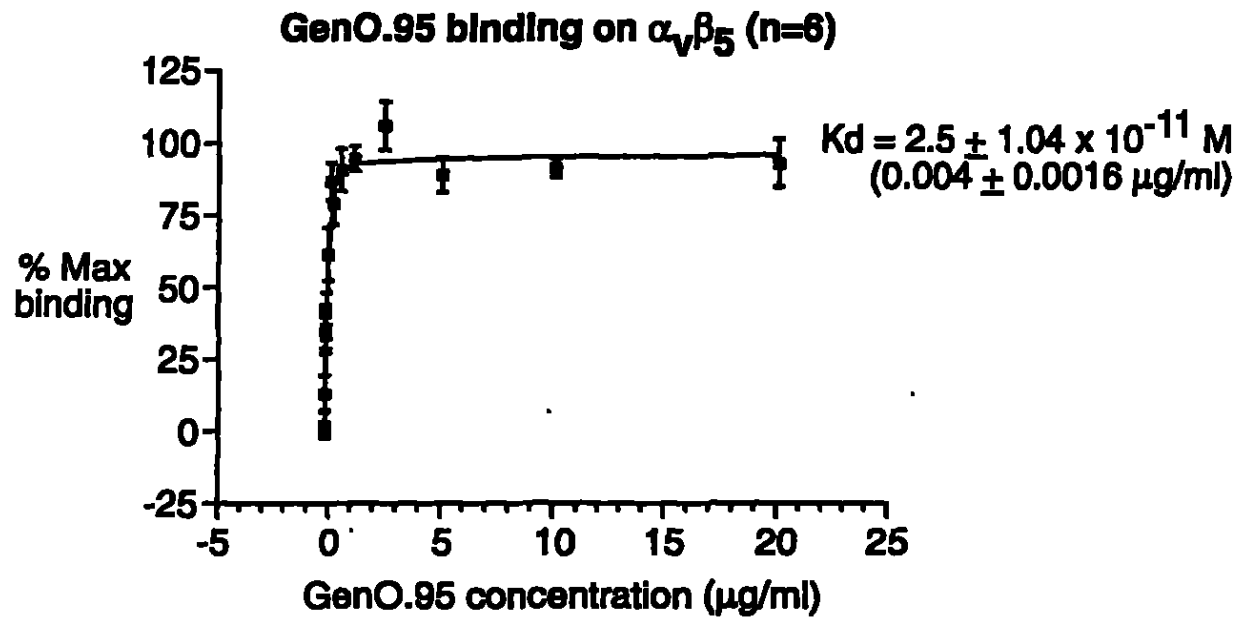
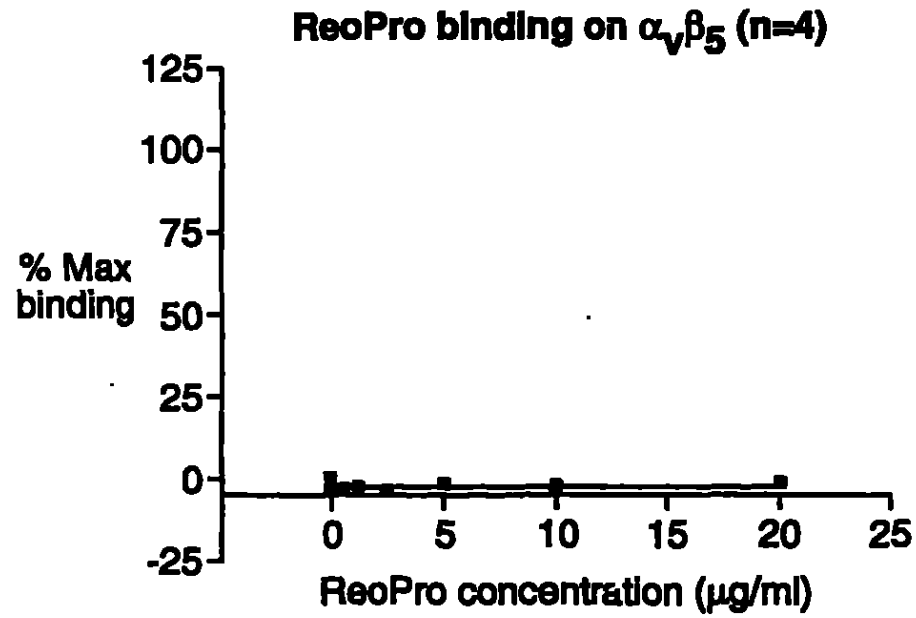


FIG. 6B



10/30

FIG. 7A

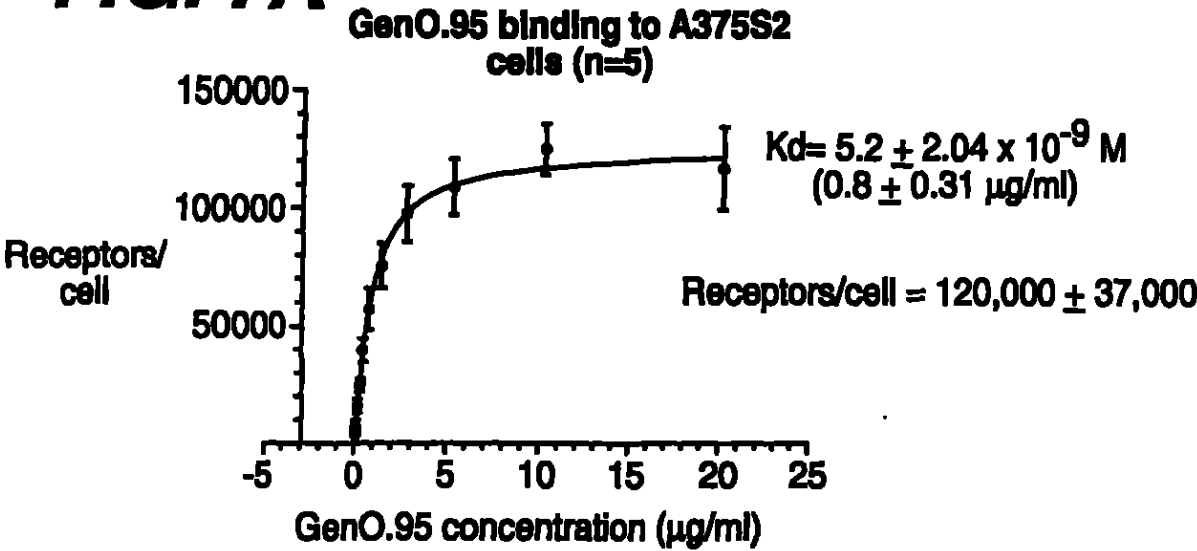


FIG. 7B

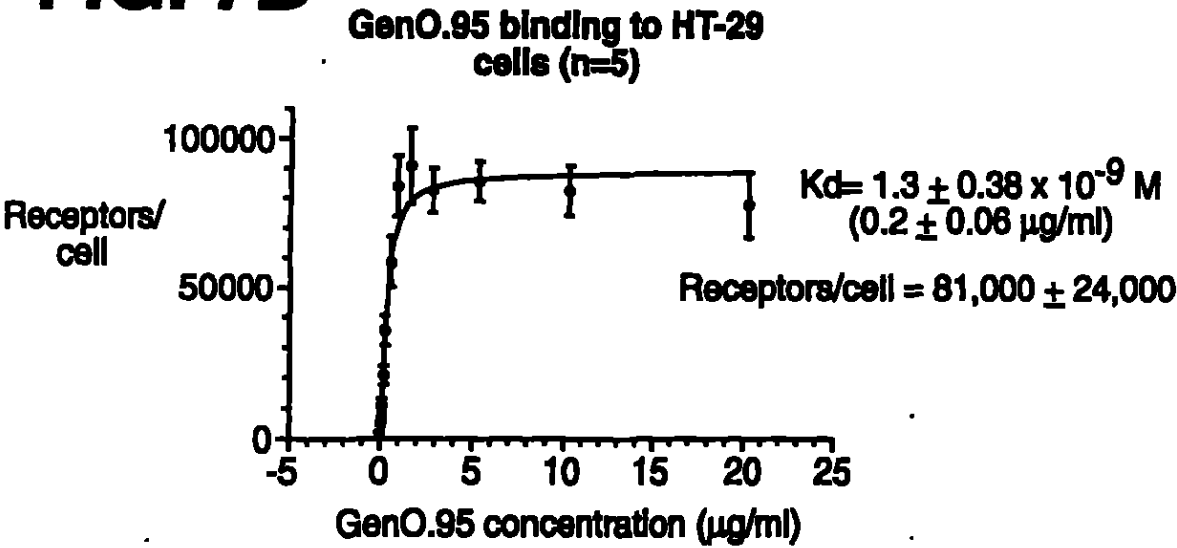
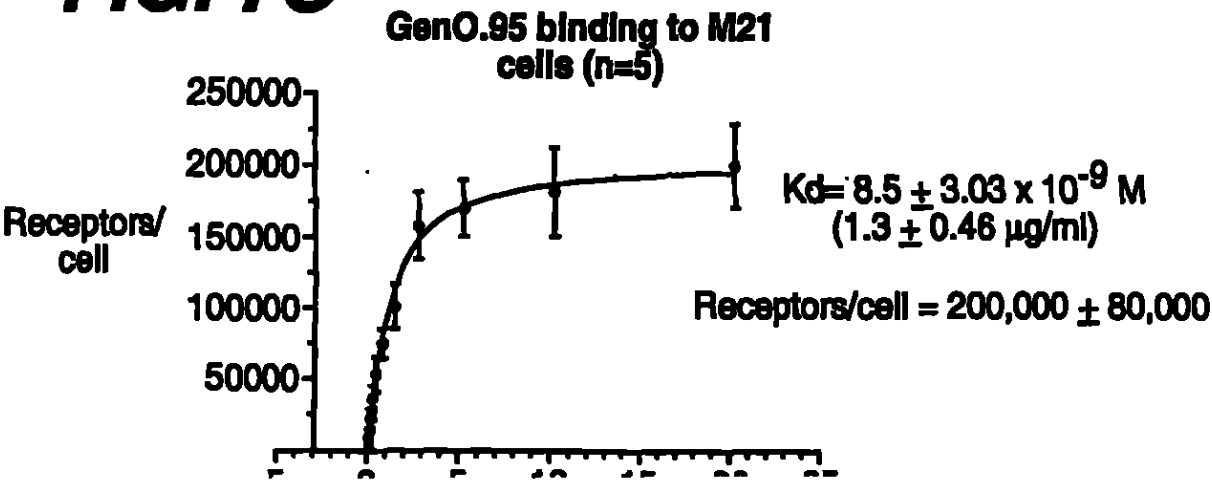
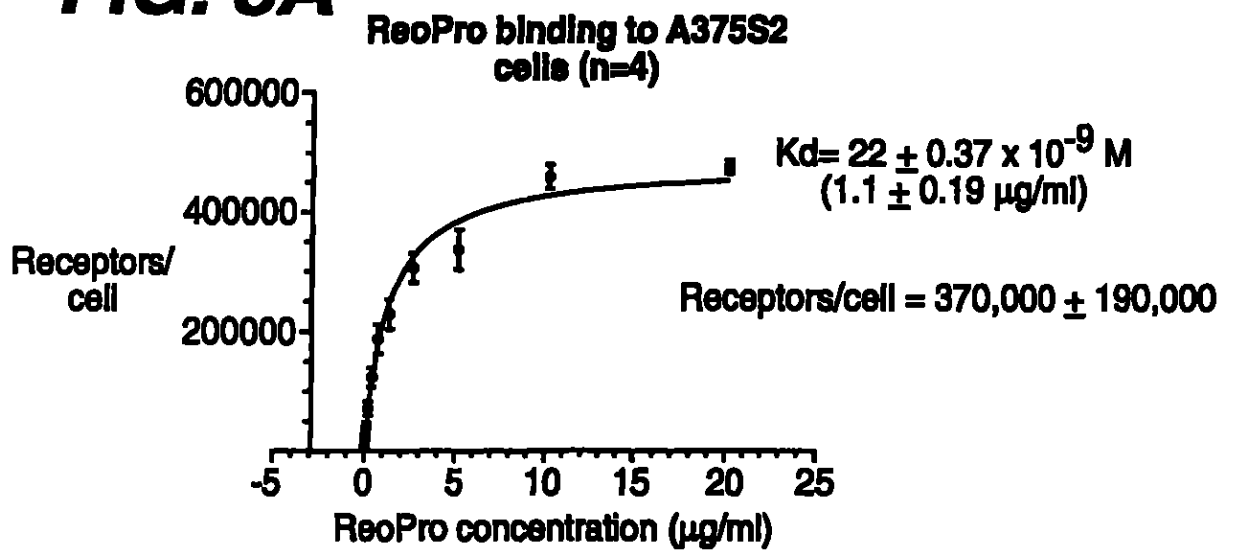
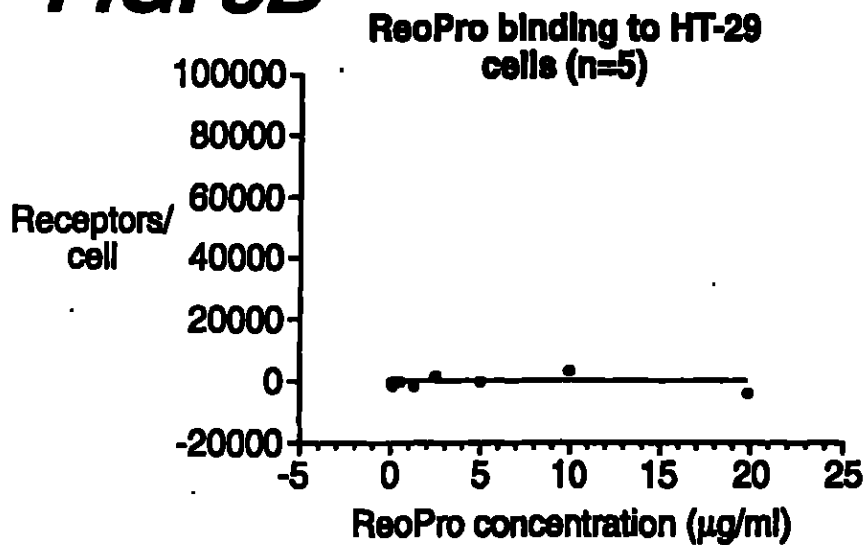
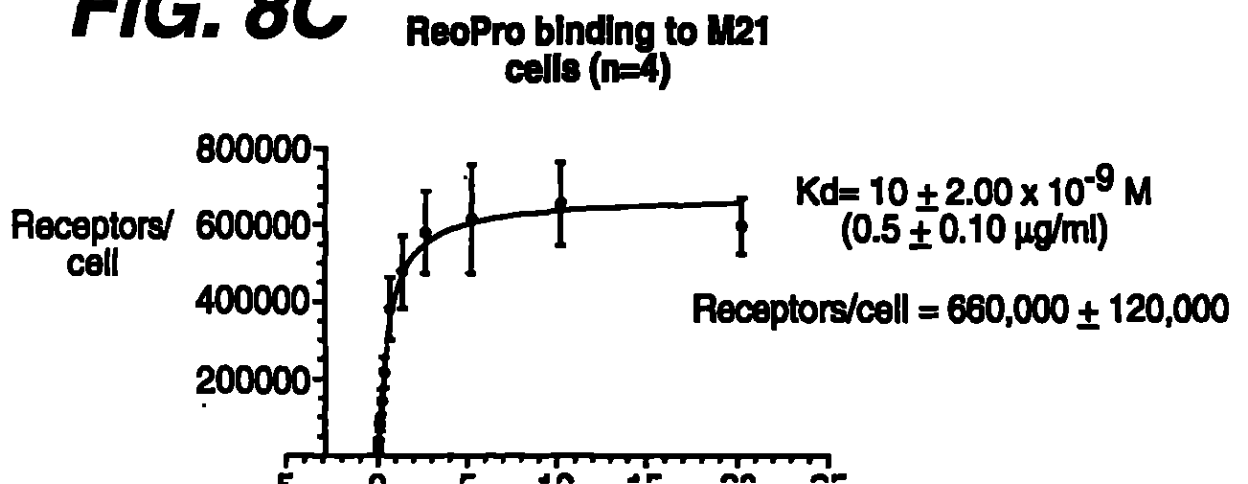


FIG. 7C



11/30

FIG. 8A**FIG. 8B****FIG. 8C**

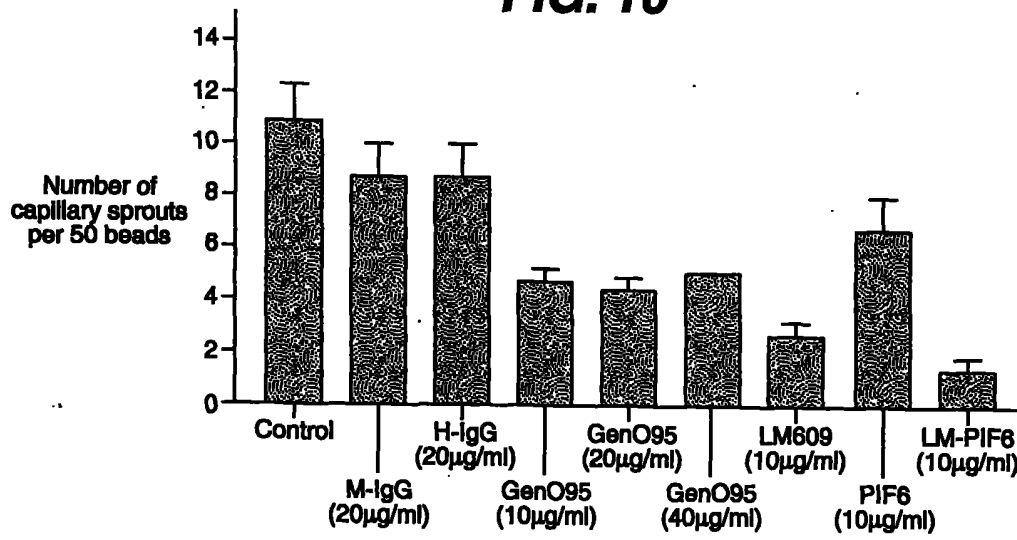
12/30

FIG. 9



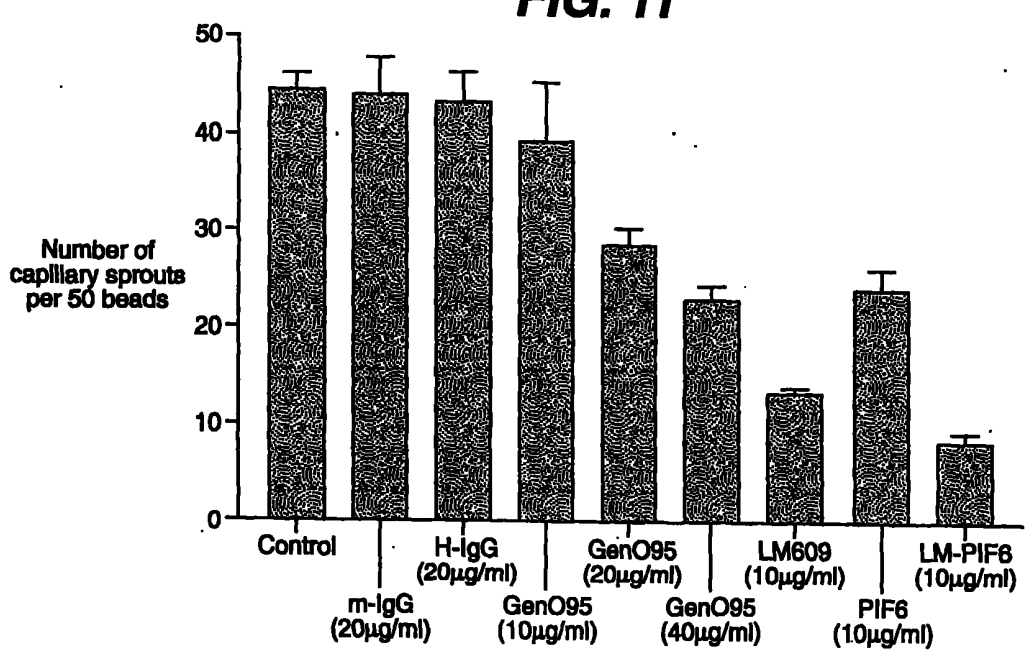
13/30

FIG. 10



14/30

FIG. 11



15/30

FIG. 12A

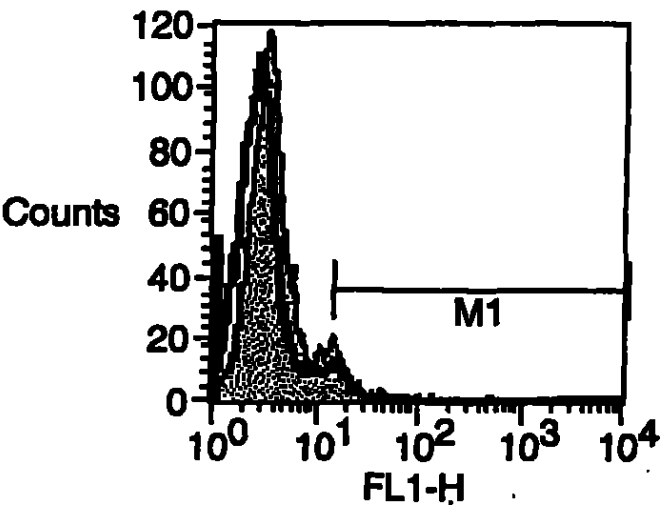


FIG. 12B

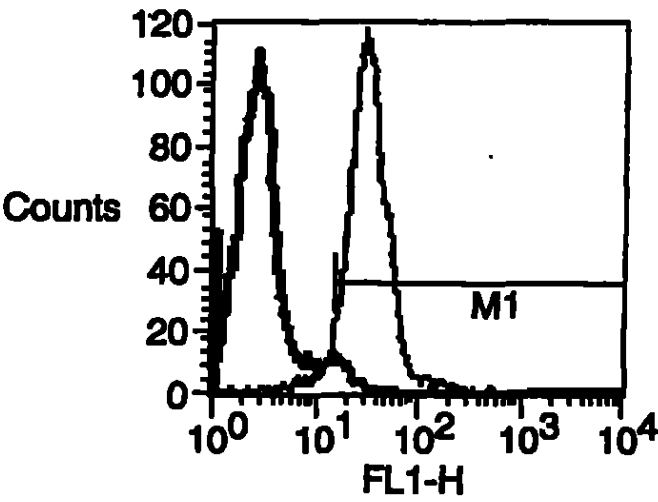
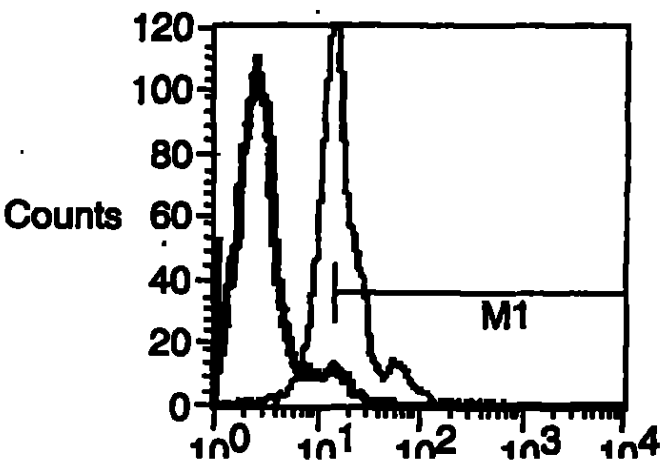


FIG. 12C



16/30

FIG. 12D

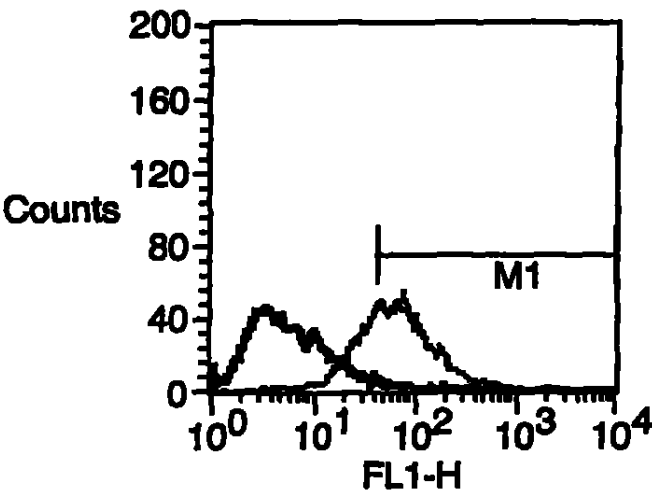


FIG. 12E

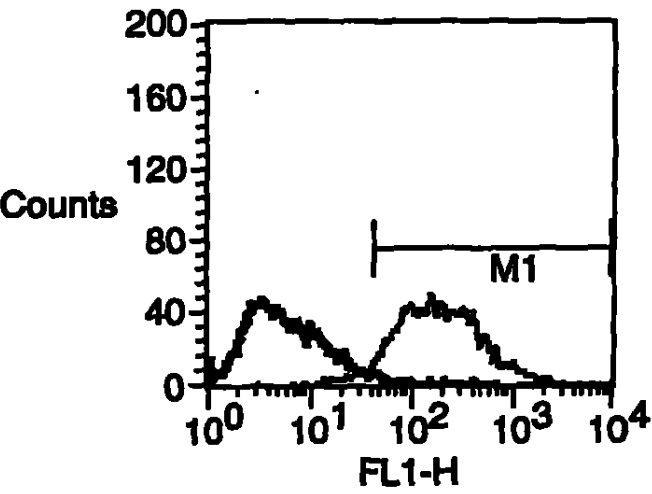
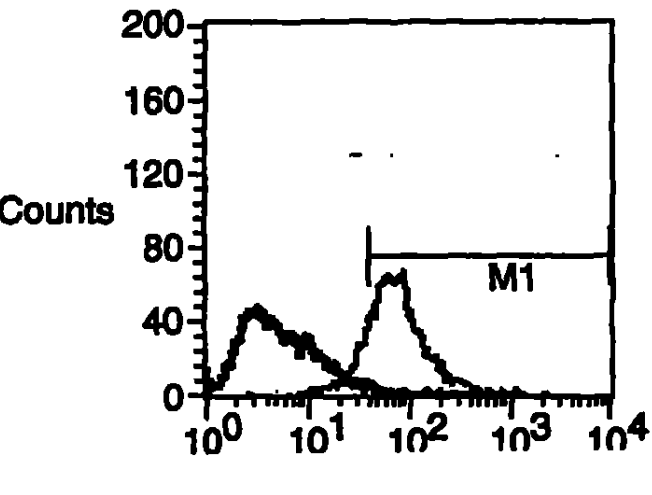
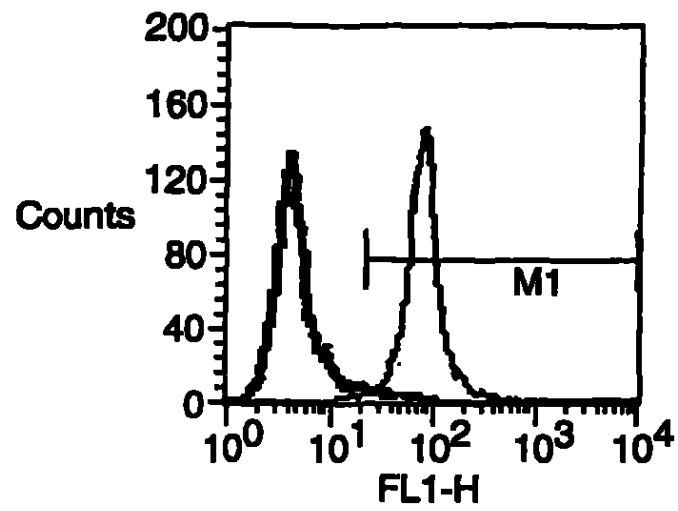
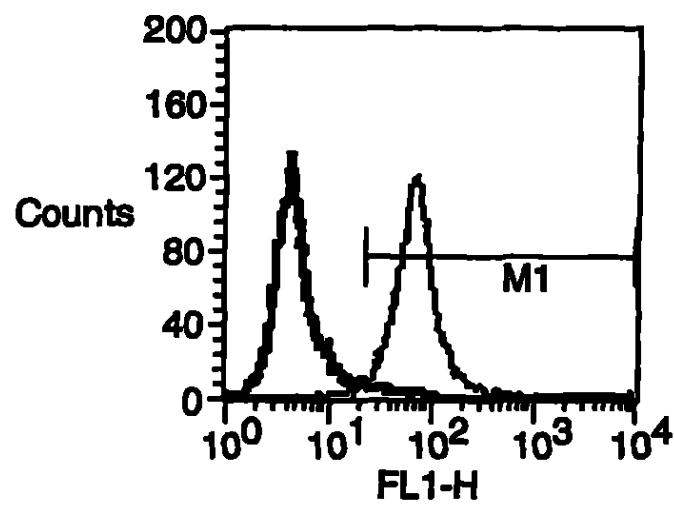
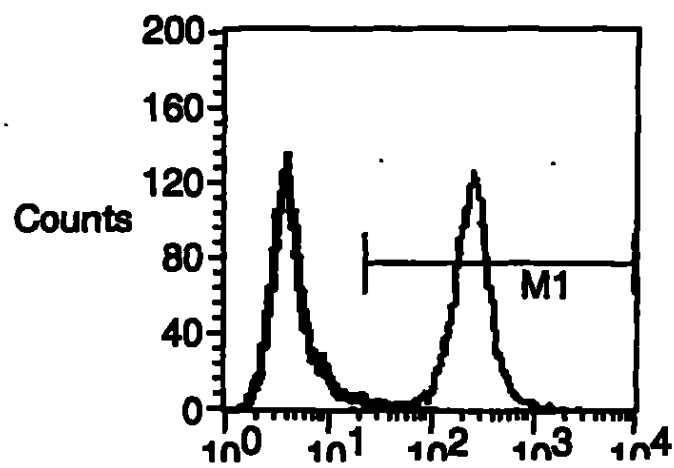


FIG. 12F



17/30

FIG. 12G**FIG. 12H****FIG. 12I**

18/30

FIG. 13

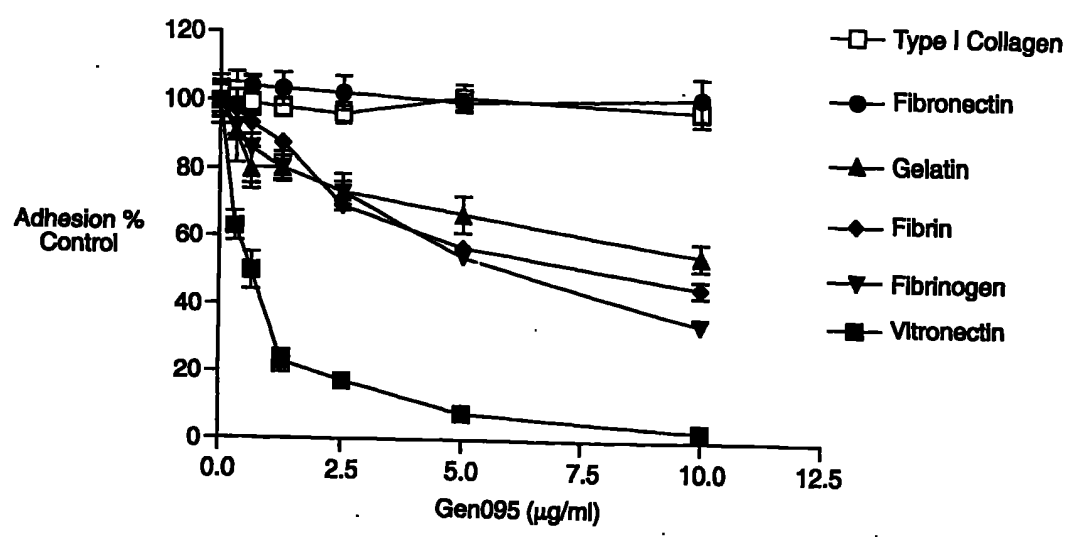
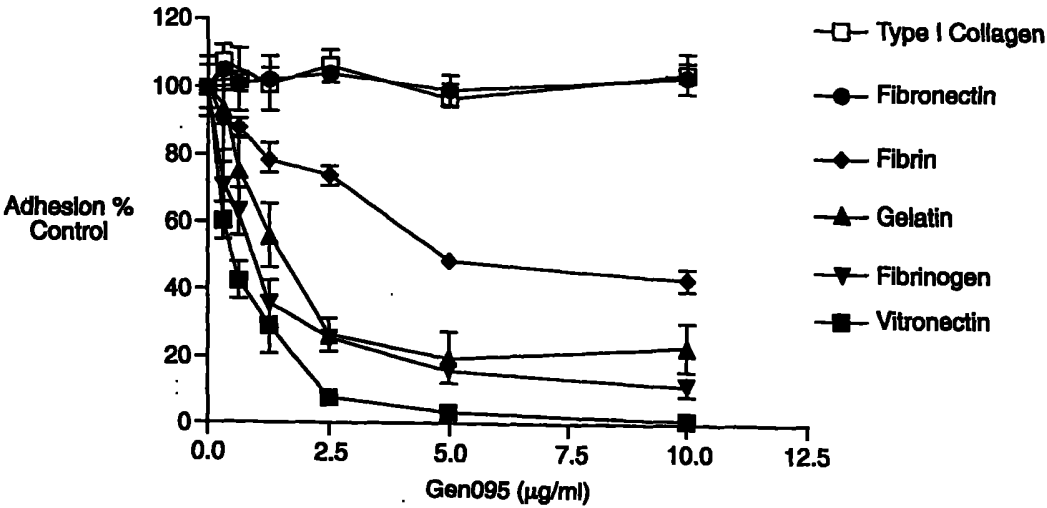


FIG. 14



242

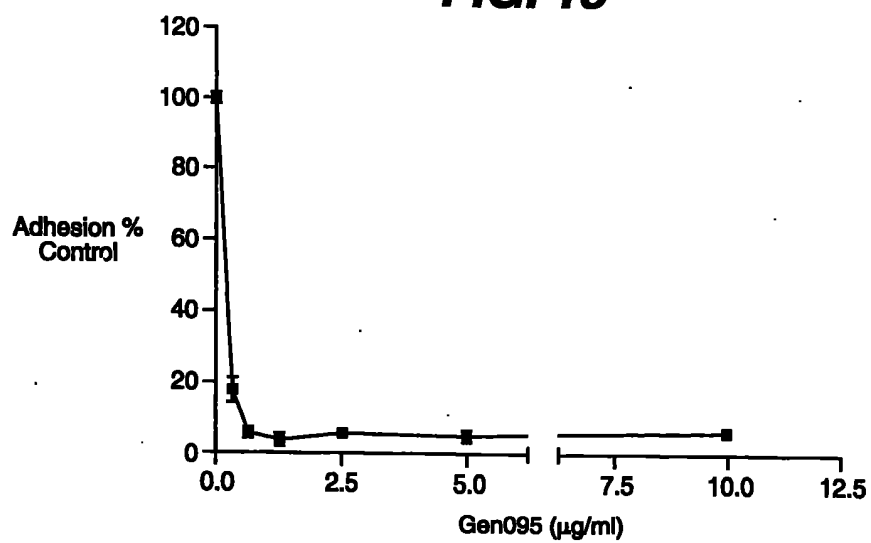
WO 02/12501

20/30

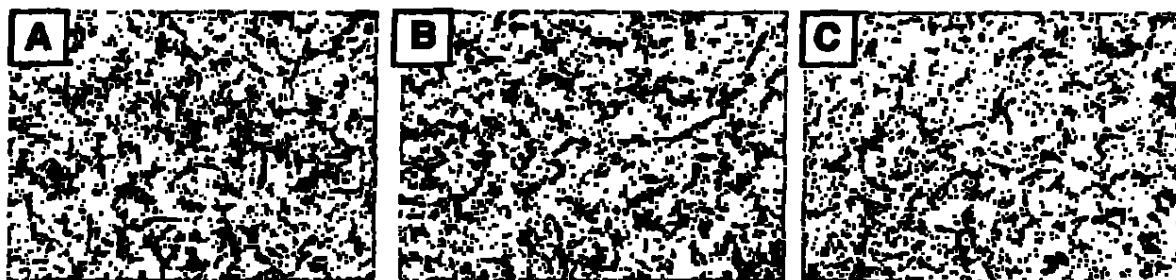
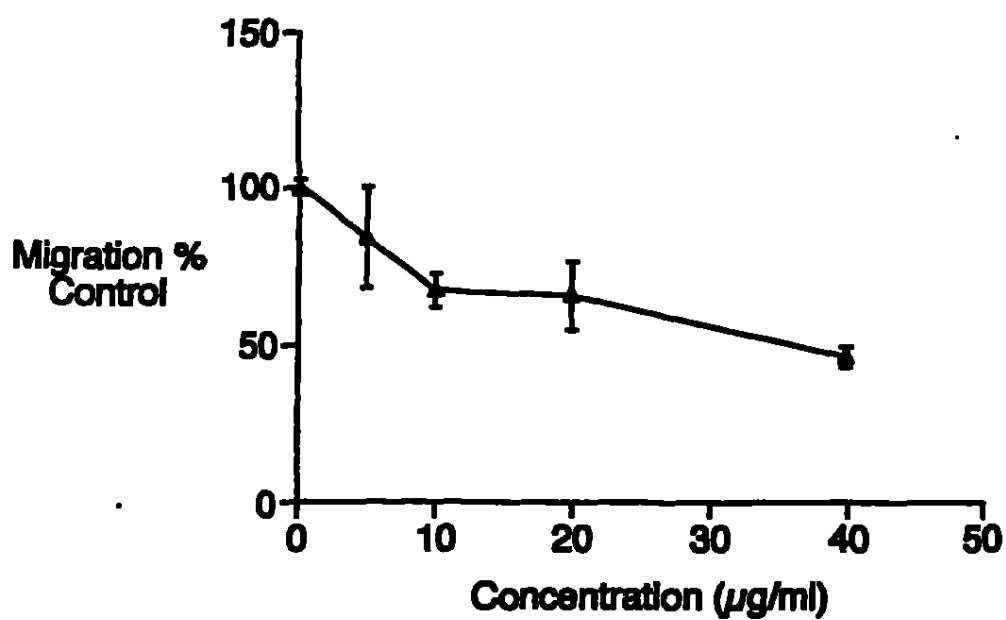
PCT/US01/24784

242

FIG. 15

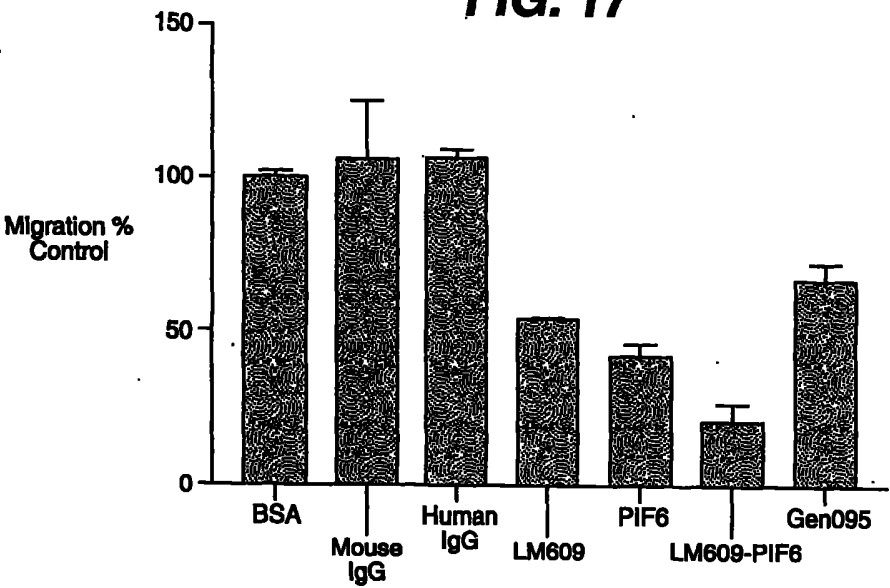


21/30

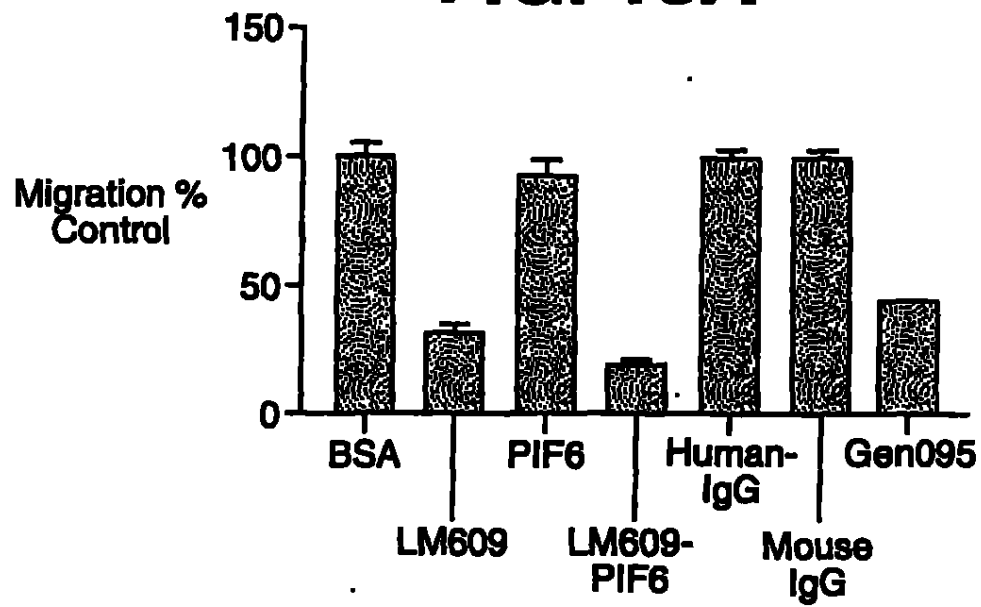
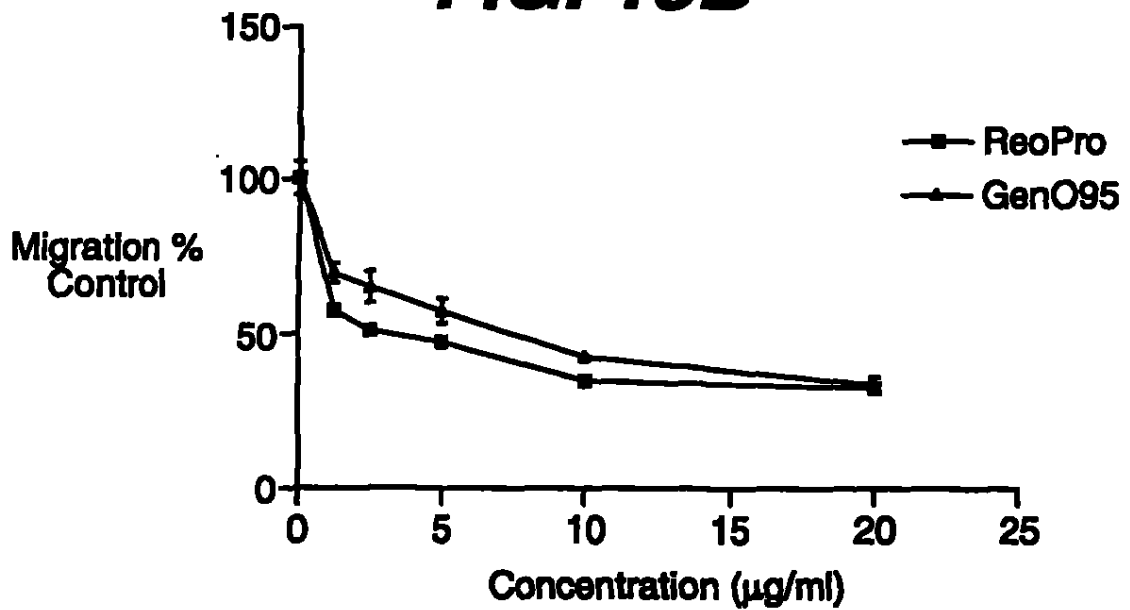
FIG. 16A FIG. 16B FIG. 16C**FIG. 16D**

22/30

FIG. 17



23/30

FIG. 18A**FIG. 18B**

24/30

FIG. 18C

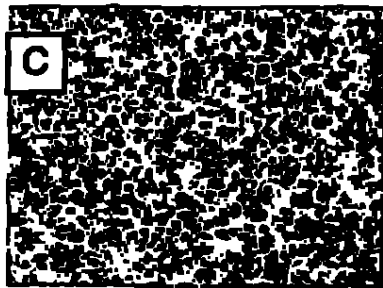


FIG. 18D

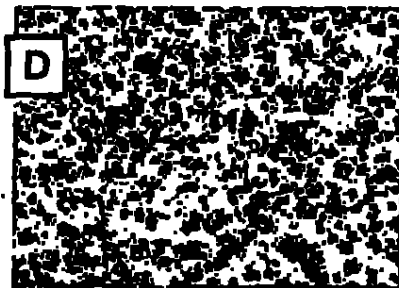
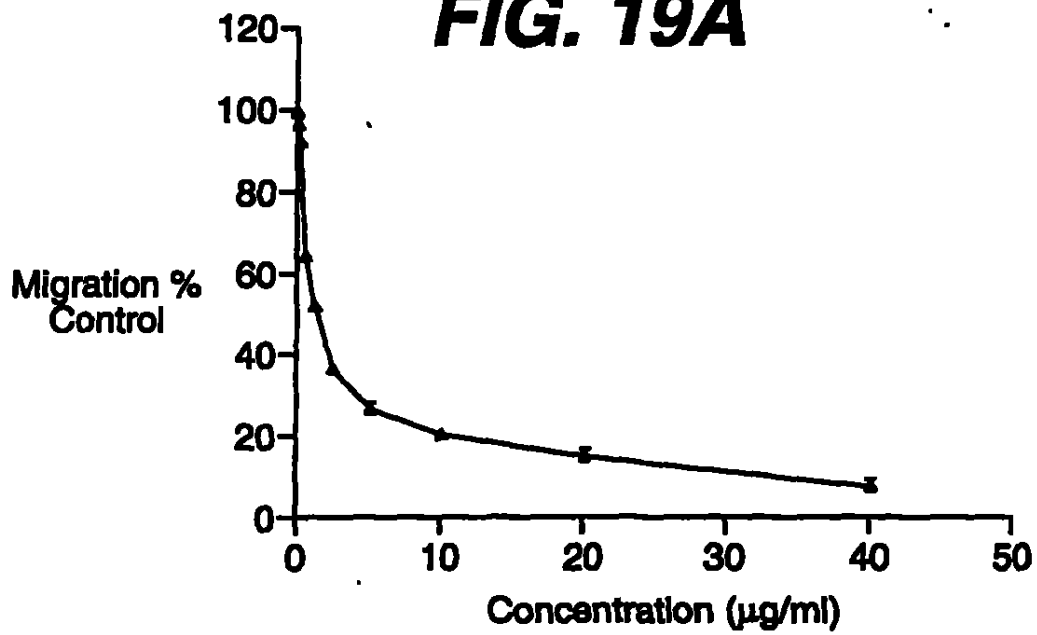
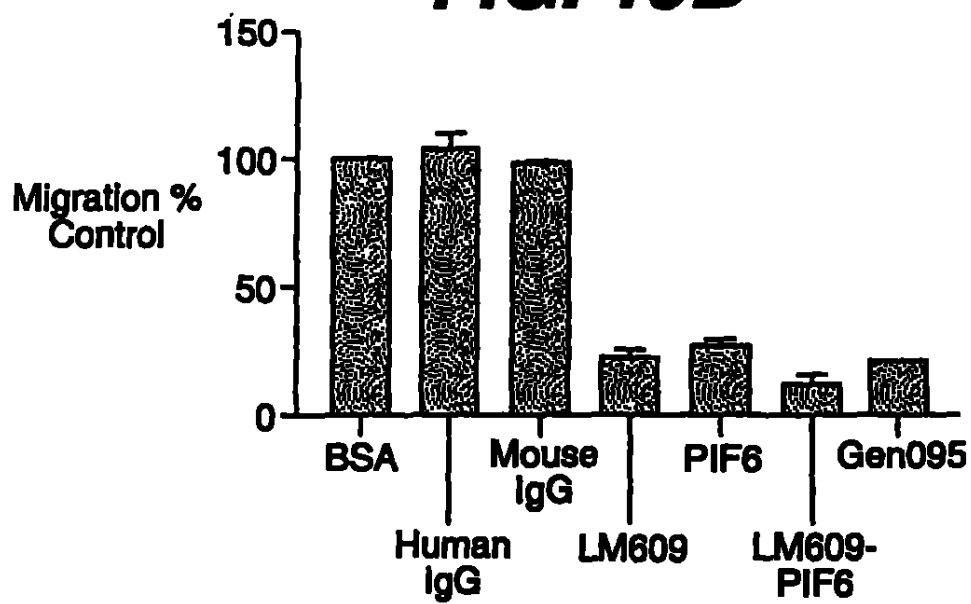


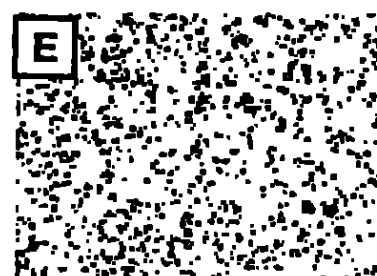
FIG. 18E

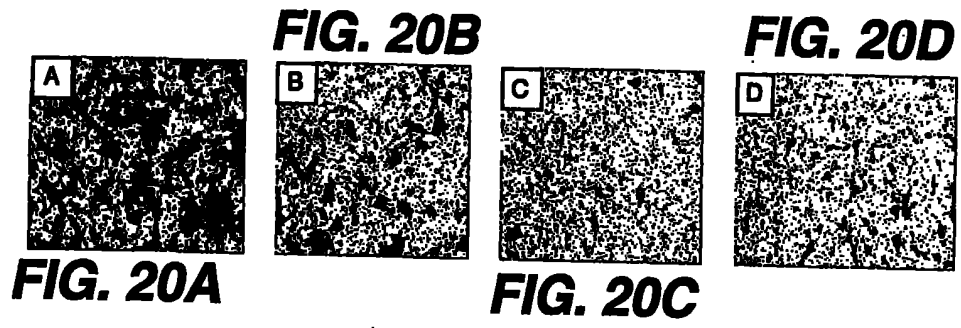


25/30

FIG. 19A**FIG. 19B**

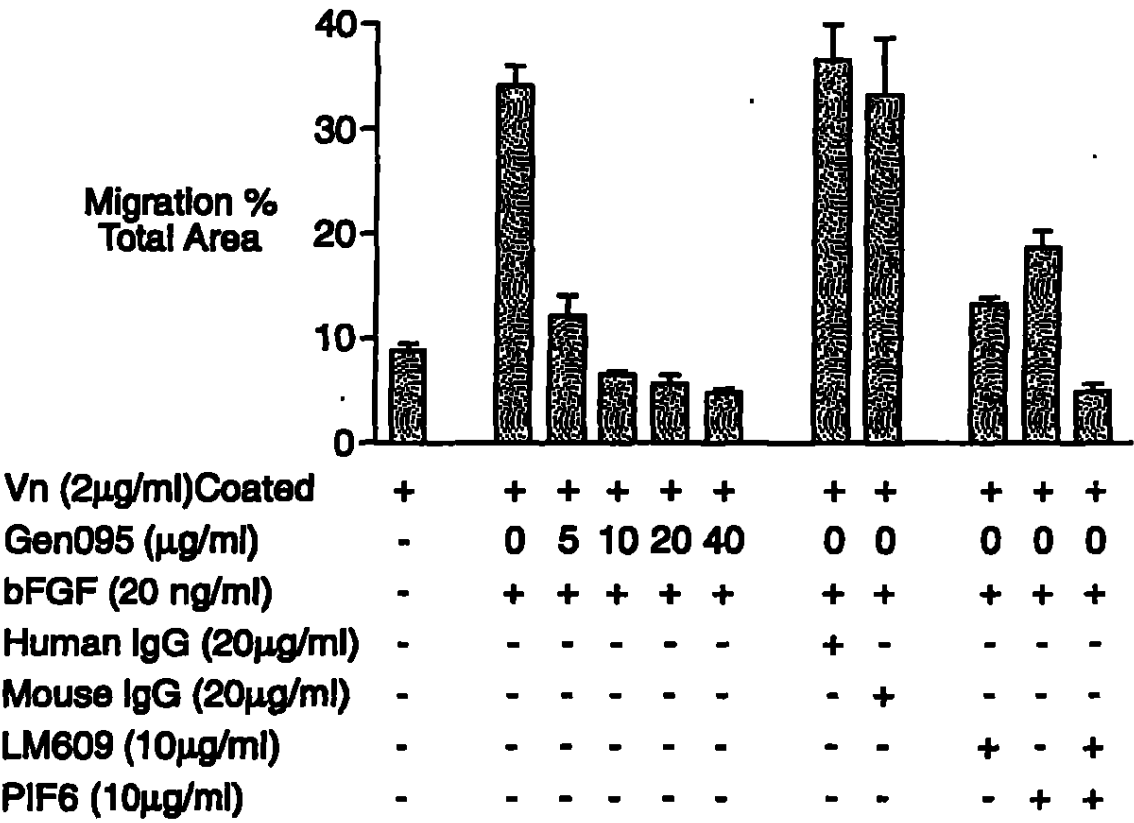
26/30

FIG. 19C**FIG. 19D****FIG. 19E**



28/30

FIG. 20E



29/30

FIG. 21A

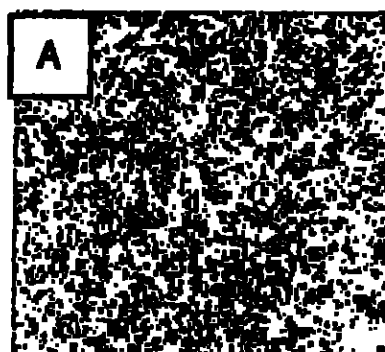
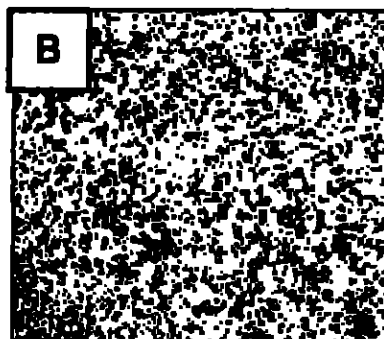


FIG. 21B



30/30

FIG. 21C

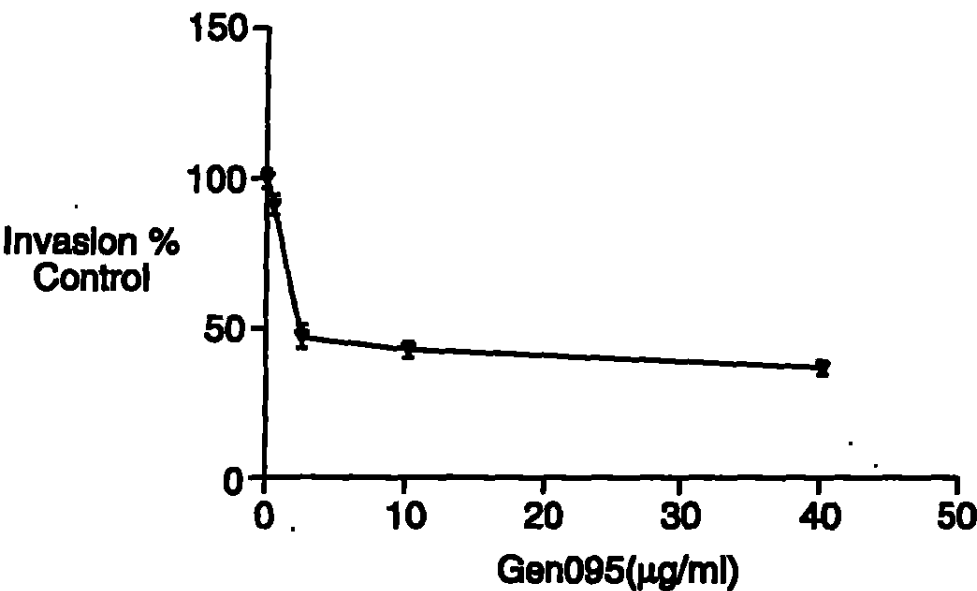
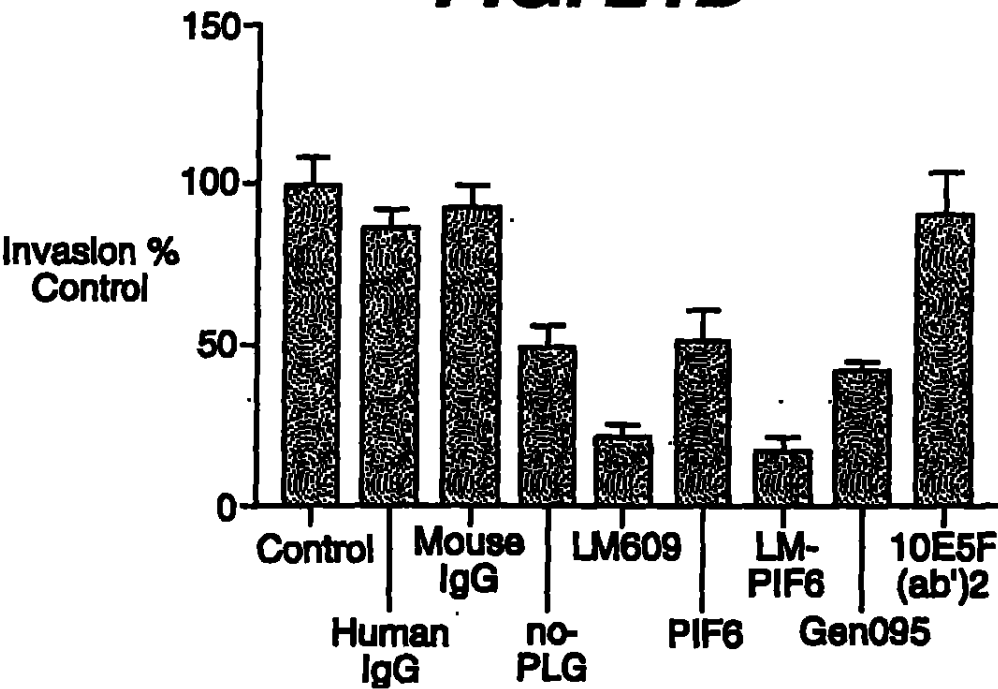


FIG. 21D



SEQUENCE LISTING

<110> Giles-Komar, Jill; Heavner, George; Snyder, Linda; Trikha, Mohit

<120> DUAL INTEGRIN ANTIBODIES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES

<130> CEN 249

<160> 17

<170> PatentIn Ver 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Tyr Thr Met His
5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

WO 02/12501

PCT/US01/24784

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
1 5

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

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

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

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

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

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

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

WO 02/12501

PCT/US01/24784

100

105

<210> 9
 <211> 1048
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
 20 25 30

Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
 35 40 45

Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
 50 55 60

Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
 65 70 75 80

Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
 85 90 95

Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
 100 105 110

Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
 115 120 125

Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
 130 135 140

Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
 165 170 175

Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
 180 185 190

Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr
 195 200 205

Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys
 210 215 220

Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr
 225 230 235 240

Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val
 245 250 255

Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly
 260 265 270

Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly
 275 280 285
 Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala
 290 295 300
 Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr
 305 310 315 320
 Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp
 325 330 335
 Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala
 340 345 350
 Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala
 355 360 365
 Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys
 385 390 395 400
 Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val
 405 410 415
 Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro
 420 425 430
 Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly
 435 440 445
 Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu
 450 455 460
 Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
 485 490 495
 Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp
 500 505 510
 Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu
 515 520 525
 Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser
 565 570 575
 Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg

580	585	590
Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu 595	600	605
Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu 610	615	620
Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val 625	630	635 640
Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr 645	650	655
Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu 660	665	670
Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg 675	680	685
Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn 690	695	700
Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly 705	710	715 720
Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu 725	730	735
Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu 740	745	750
Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val 755	760	765
Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Ile Phe 770	775	780
Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Gln 785	790	795 800
Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly 805	810	815
Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys 820	825	830
Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly 835	840	845
Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys 850	855	860
Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln 865	870	875 880
Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu 885	890	895

WO 02/12501

PCT/US01/24784

Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile
900 905 910

Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr
915 920 925

Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln
930 935 940

Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu
945 950 955 960

Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu
965 970 975

Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val
980 985 990

Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu
995 1000 1005

Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg Val
1010 1015 1020

Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro His Glu
1025 1030 1035 1040

Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr
1045

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
agatatacta tgcac 15

<210> 11
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 11
gttatatcat ttgatggaag caataaatac taogtagact cogtgaaggg c 51

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 12
gagggccggg gatogtatgc ttttgatate 30

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13
ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agctacttag cc 33

<210> 14

WO 02/12501

PCT/US01/24784

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gatgcatcca acagggcc

18

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cagcagcgta gcaactggcc t

21

<210> 16

<211> 788

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Ala Thr Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
20 25 30

Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
35 40 45

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
50 55 60

Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
65 70 75 80

Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
85 90 95

Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
100 105 110

Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
115 120 125

Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
130 135 140

Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
145 150 155 160

Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg
165 170 175

Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr
180 185 190

Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr
195 200 205

WO 02/12501

PCT/US01/24784

Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp
 210 215 220
 Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg
 225 230 235 240
 Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr
 245 250 255
 Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu
 260 265 270
 Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu
 275 280 285
 Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp
 290 295 300
 Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu
 305 310 315 320
 Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val
 325 330 335
 Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro
 340 345 350
 Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln
 355 360 365
 Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu
 370 375 380
 Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys
 405 410 415
 Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys
 420 425 430
 Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys
 435 440 445
 Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln
 450 455 460
 Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr
 465 470 475 480
 Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln
 485 490 495
 Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys
 500 505 510
 Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu
 515 520 525

WO 02/12501

PCT/US01/24784

Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly
 530 535 540
 Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu
 545 550 555 560
 Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp
 565 570 575
 Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr
 580 585 590
 Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu
 595 600 605
 Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys
 610 615 620
 Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys
 625 630 635 640
 Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Glu Pro Tyr Met Thr Glu Asn Thr
 645 650 655
 Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys
 660 665 670
 Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp
 675 680 685
 Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile
 690 695 700
 Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu
 705 710 715 720
 Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala
 725 730 735
 Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu
 740 745 750
 Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala
 755 760 765
 Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr
 770 775 780
 Tyr Arg Gly Thr
 785

<210> 17
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Met Pro Arg Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Ala Cys Leu Leu Gly Leu Cys

WO 02/12501

PCT/US01/24784

1	5	10	15
Ala Leu Leu Pro Arg Leu Ala Gly Leu Asn Ile Cys Thr Ser Gly Ser	20	25	30
Ala Thr Ser Cys Glu Glu Cys Leu Leu Ile His Pro Lys Cys Ala Trp	35	40	45
Cys Ser Lys Glu Asp Phe Gly Ser Pro Arg Ser Ile Thr Ser Arg Cys	50	55	60
Asp Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Gly Cys Gly Gly Glu Ile Glu	65	70	75
Ser Pro Ala Ser Ser Phe His Val Leu Arg Ser Leu Pro Leu Ser Ser	85	90	95
Lys Gly Ser Gly Ser Ala Gly Trp Asp Val Ile Gln Met Thr Pro Gln	100	105	110
Glu Ile Ala Val Asn Leu Arg Pro Gly Asp Lys Thr Thr Phe Gln Leu	115	120	125
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met	130	135	140
Asp Leu Ser Leu Ser Met Lys Asp Asp Leu Asp Asn Ile Arg Ser Leu	145	150	155
Gly Thr Lys Leu Ala Glu Glu Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Phe Arg	165	170	175
Leu Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Asp Ile Ser Pro Phe Ser Tyr	180	185	190
Thr Ala Pro Arg Tyr Gln Thr Asn Pro Cys Ile Gly Tyr Lys Leu Phe	195	200	205
Pro Asn Cys Val Pro Ser Phe Gly Phe Arg His Leu Leu Pro Leu Thr	210	215	220
Asp Arg Val Asp Ser Phe Asn Glu Glu Val Arg Lys Gln Arg Val Ser	225	230	235
Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Val Leu Gln Ala	245	250	255
Ala Val Cys Lys Glu Lys Ile Gly Trp Arg Lys Asp Ala Leu His Leu	260	265	270
Leu Val Phe Thr Thr Asp Asp Val Pro His Ile Ala Leu Asp Gly Lys	275	280	285
Leu Gly Gly Leu Val Gln Pro His Asp Gly Gln Cys His Leu Asn Glu	290	295	300
Ala Asn Glu Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Met Asp Tyr Pro Ser Leu Ala	305	310	315
			320

WO 02/12501

PCT/US01/24784

Leu Leu Gly Glu Lys Leu Ala Glu Asn Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala
 325 330 335
 Val Thr Lys Asn His Tyr Met Leu Tyr Lys Asn Phe Thr Ala Leu Ile
 340 345 350
 Pro Gly Thr Thr Val Glu Ile Leu Asp Gly Asp Ser Lys Asn Ile Ile
 355 360 365
 Gln Leu Ile Ile Asn Ala Tyr Asn Ser Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu
 370 375 380
 Ser Val Trp Asp Gln Pro Glu Asp Leu Asn Leu Phe Phe Thr Ala Thr
 385 390 395 400
 Cys Gln Asp Gly Val Ser Tyr Pro Gly Gln Arg Lys Cys Glu Gly Leu
 405 410 415
 Lys Ile Gly Asp Thr Ala Ser Phe Glu Val Ser Leu Glu Ala Arg Ser
 420 425 430
 Cys Pro Ser Arg His Thr Glu His Val Phe Ala Leu Arg Pro Val Gly
 435 440 445
 Phe Arg Asp Ser Leu Glu Val Gly Val Thr Tyr Asn Cys Thr Cys Gly
 450 455 460
 Cys Ser Val Gly Leu Glu Pro Asn Ser Ala Arg Cys Asn Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Tyr Val Cys Gly Leu Cys Glu Cys Ser Pro Gly Tyr Leu Gly Thr
 485 490 495
 Arg Cys Glu Cys Gln Asp Gly Glu Asn Gln Ser Val Tyr Gln Asn Leu
 500 505 510
 Cys Arg Glu Ala Glu Gly Lys Pro Leu Cys Ser Gly Arg Gly Asp Cys
 515 520 525
 Ser Cys Asn Gln Cys Ser Cys Phe Glu Ser Glu Phe Gly Lys Ile Tyr
 530 535 540
 Gly Pro Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Ser Cys Ala Arg Asn Lys Gly
 545 550 555 560
 Val Leu Cys Ser Gly His Gly Glu Cys His Cys Gly Glu Cys Lys Cys
 565 570 575
 His Ala Gly Tyr Ile Gly Asp Asn Cys Asn Cys Ser Thr Asp Ile Ser
 580 585 590
 Thr Cys Arg Gly Arg Asp Gly Gln Ile Cys Ser Glu Arg Gly His Cys
 595 600 605
 Leu Cys Gly Gln Cys Gln Cys Thr Glu Pro Gly Ala Phe Gly Glu Met
 610 615 620
 Cys Gln Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Ser Thr Lys Arg Asp
 625 630 635 640

Cys Val Glu Cys Pro Leu Leu His Ser Gly Lys Pro Asp Asn Gln Thr
 645 650 655
 Cys His Ser Leu Cys Arg Asp Glu Val Ile Thr Trp Val Asp Thr Ile
 660 665 670
 Val Lys Asp Asp Gln Glu Ala Val Leu Cys Phe Tyr Lys Thr Ala Lys
 675 680 685
 Asp Cys Val Met Met Phe Thr Tyr Val Glu Leu Pro Ser Gly Lys Ser
 690 695 700
 Asn Leu Thr Val Leu Arg Glu Pro Glu Cys Gly Asn Thr Pro Asn Ala
 705 710 715 720
 Met Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Gly Ser Ile Leu Leu Val Gly Leu
 725 730 735
 Ala Leu Leu Ala Ile Trp Lys Leu Leu Val Thr Ile His Asp Arg Arg
 740 745 750
 Glu Phe Ala Lys Phe Gln Ser Glu Arg Ser Arg Ala Arg Tyr Glu Met
 755 760 765
 Ala Ser Asn Pro Leu Tyr Arg Lys Pro Ile Ser Thr His Thr Val Asp
 770 775 780
 Phe Thr Phe Asn Lys Phe Asn Lys Ser Tyr Asn Gly Thr Val Asp
 785 790 795



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
Jimena Escobar Uribe
Apoderado
Centocor, Inc.

Oficio N° 07260

ASUNTO:	Radicación N°	03-017962
	Solicitud Internacional	PCT/US2001/24784
	Fecha inicio fase nacional	07/03/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene los dibujos. (Art. 26-d) Decisión 486 y numeral 5.2.5, capítulo quinto del título décimo de la Circular Única de la SIC).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA GESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

05 SET. 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.


11/5/09/003

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD	()	()

- | | | |
|---|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | () | () |
| - Descripción de la invención. | () | () |
| - Dibujos de ser estos pertinentes. | () | () |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA ()	INCOMPLETA ()
--------------	----------------

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

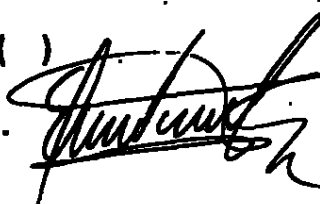
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()
--------------	----------------

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA ()	INCOMPLETA ()
--------------	----------------

Firma Responsable:



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 02017962 00000000 Folios: 264
Fecha (AMB): 2003-03-03 16:02:18
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTAC
Dependencia: ENEB DIVISION DE NUEVAS CREACIONES