

Clarke, Modet & C<sup>o</sup>  
COLOMBIA

ESCOBAR-URIBE ASOCIADOS  
Intellectual Property

2529/P

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-017962-00010-0000

Fecha: 2007-11-19 15:53:36 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 168

Re: Expediente No. **03-017.962**  
Solicitud de patente a nombre de **Centocor, Inc.**

Yo, JIMENA ESCOBAR URIBE, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Cra. 11 No. 86-53 Piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **Centocor, Inc.**, domiciliada en Malvern, Pennsylvania, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 08706 del 19 de julio de 2007 relacionado con el concepto técnico de fondo No. 1012, me permito manifestar lo siguiente:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nueva memoria descriptiva y nuevo capítulo reivindicatorio, en los cuales se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1 Se ordenó la secuencia lógica de las páginas que presentaban problemas de espacios en blanco, con lo cual ahora se puede realizar una lectura secuencial y coherente de la materia divulgada en la presente invención.

1.2. Se reemplazó el antiguo capítulo reivindicatorio por uno comprendido de seis reivindicaciones dirigidas al anticuerpo recombinante monoclonal humano que enlaza específicamente integrinas alfa-v-beta 3 y alfa-V-beta 5 caracterizado porque contiene las secuencias de amino ácido (CDR) de cadena pesada de SEQ ID No: 1, 2 y 3 y las secuencias de aminoácido CDR de cadena ligera de SEQ ID Nos.: 4, 5 y 6. Además, a la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo y a la molécula de ácido nucleico que las codifica.

Sobre este particular, me permito decir que las anteriores modificaciones tienen su debido sustento dentro de la memoria descriptiva y el antiguo capítulo reivindicatorio y por ende, las mismas no amplían la materia objeto de la presente invención.

Para este efecto, me permito acompañar el recibo número 07-89,775 del 1 de noviembre de 2007 con el cual queda cubierta la tasa correspondiente a la modificación en cuanto al capítulo reivindicatorio.

## **2. Claridad de la solicitud**

### **2.1 Descripción de la invención.**

Sobre este particular, me permito manifestar que la presente invención en su descripción sí posee claridad, toda vez que para una persona versada en la materia serán lo suficientemente específicas las características técnicas de los anticuerpos desarrollados a partir de los datos encontrados en la descripción y del listado de secuencias que acompañan a la misma.

En este orden de ideas se dirige la atención de ese despacho a las nuevas páginas 108 en adelante donde a través de un estudio minucioso se puede constatar que se revela de manera completa y clara los procedimientos para realizar los experimentos realizados para sustentar la patente.

### **2.2 Capítulo reivindicatorio**

En cuanto a las objeciones de claridad expuestas por el examinador en su concepto técnico, me permito decir que gracias a las modificaciones realizada en las reivindicaciones quedan completamente superadas, toda vez que las mismas reclaman ahora un anticuerpo con secuencias determinadas y no hay ambigüedad respecto a lo que se desea reivindicar, es decir, anticuerpos monoclonales recombinantes para la unión con integrinas del tipo alfa V beta 3 y 5.

## **3. Unidad de Invención**

Respecto a esta objeción establecida por el examinador con base en el capítulo reivindicatorio anterior, resulta prudente señalar que el nuevo juego de reivindicaciones cumple con el requerimiento de unidad, toda vez que existe un elemento técnico común el cual es el anticuerpo recombinante monoclonal humano con las características reveladas en la nueva reivindicación 1.

## **4. Material biológico**

Respecto del material biológico revelado en la presente invención, resulta necesario decir que el mismo no es un material aislado de la naturaleza, sino que es el resultado de la creatividad del solicitante a fin de lograr anticuerpos monoclonales recombinantes. En este sentido, me permito señalar que además con la aclaración en el capítulo reivindicatorio en el sentido que el anticuerpo es recombinante, una persona medianamente versada en la técnica comprenderá que

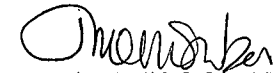
los anticuerpos revelados en esta solicitud, son el producto de técnicas de combinación conocidas en el campo de la bioquímica para obtener moléculas recombinantes.

### 5. Excepciones a la patentabilidad

En cuanto a las antiguas reivindicaciones 5, 10, 15, 20 y 25 que reclamaban métodos de diagnóstico, me permito decir que las mismas ya no hacen parte del pliego reivindicatorio ahora presentado y por lo tanto, queda cabalmente superada esta objeción.

En conclusión, me permito decir que a la luz de la modificación realizada en el capítulo reivindicatorio y los ajustes realizados en la memoria descriptiva, la presente invención cumple con los requerimientos de claridad, unidad de invención. En consecuencia, solicito comedidamente a ese despacho conceder el privilegio de patente a la solicitud en estudio.

Señor Superintendente,



JIMENA ESCOBAR URIBE  
C.C.39.779.452 de Usaquén  
T.P.No. 68228  
Còd.5376

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 89,775  
FECHA : NOVIEMBRE 1 DE 2007

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE               | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|---------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|---------------|
| CLARKE MODET Y CO. COLOMB | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 71030245 | 01/11/2007 | 32,806,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                       | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|--------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-03 | CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA |                |
|       |             | 12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES  | 99,000.00      |
|       |             | TOTAL :                        | \$ 99,000.00   |

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

**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-duales, ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, y métodos de hacer y  
15 utilizar los mismos, incluyendo formulaciones terapéuticas, administración y dispositivos.

**TÉCNICA RELACIONADA**

Existe ahora evidencia considerable de que el desarrollo progresivo de  
20 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, Oncol.54:177-184). Estudios recientes han definido adicionalmente los papeles de integrines en el proceso  
25 angiogénico. Los integrines son 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 integrines que son esperados 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 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; 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 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 humanos. Tal respuesta inmune puede originar una evacuación intervenida por complejo inmune de los anticuerpos o fragmentos provenientes de la 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 porciones no humanas puede conducir a enfermedad de suero y/o

anafilaxis. 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 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.

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

## RESUMEN DE LA INVENCION

15 La presente invención provee anticuerpos integrines anti-duales aislados de humanos, de primates, roedores, de mamíferos, quiméricos, humanizados y/o CDR-injertados, inmunoglobulinas, productos de desdoblamiento y otras porciones y variantes especificadas de los mismos, así como también composiciones de anticuerpos integrines anti-duales, que 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 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  
20  
25 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 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 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.

10 La presente invención provee, en un aspecto, moléculas de ácido 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 recombinantes que  
15 comprenden dichas moléculas de ácido nucleico de anticuerpo integrin anti-dual, células huésped que comprenden tales ácido nucleicos y/o vectores recombinantes, así como también métodos de hacer y/o utilizar tales ácidos nucleicos de anticuerpo, vectores y/o células huésped.

20 Al menos un anticuerpo de la invención liga por lo menos un epítipo especificado específico a por lo menos una proteína integrin dual, subunidad, fragmento, porción o cualquier combinación de los mismos. El por lo menos un epítipo puede comprender por lo menos un anticuepro que une la región que comprende por lo menos una porción de dicha proteína, el cual epítipo está de  
25 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, 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) 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 un dominio funcional, extracelular, soluble, hidrofílico, externo o dominio citoplásmico, de dicha proteína integrin dual, subunidad o cualquier porción de la misma.

El por lo menos un anticuerpo opcionalmente puede comprende por lo 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 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 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 expresan integrin individual. Un anticuerpo de  
5 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  
10 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 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  
15 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 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  
20 mamífero, tal como pero no está limitado a un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, y similares.

La presente invención provee, en un aspecto, moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden, complementarias, o hibridizantes a, un polinucleótido  
25 que codifica al menos un anticuerpo de anti-idiotipo integrin dual, que comprenden por lo menos una secuencia especificada, dominio, 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 también métodos de hacer y/o usar tales  
5 ácidos nucleicos de anticuerpo de anti-idiotipo, vectores y/o células huésped.

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  
10 describe bajo condiciones en donde al menos un 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 nucleico y/o anticuerpo según aquí se describió; y (b) un portador o diluyente adecuado. El  
15 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.

20

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 antes  
25 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, dispositivo y/o método de suministrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de al menos un anticuerpo integrin anti-dual, de acuerdo con la presente invención.

5

La presente invención proporciona adicionalmente al menos un 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 diagnosis 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 cabra durante 1 hora a RT. Las placas fueron lavadas nuevamente, desarrolladas con substrato de OPD y medidas de OD a 490 nm.

20

La Figura 2 muestra una gráfica de células de calceína rotulada M21 que fueron preincubadas con muestras de anticuerpo en ausencia o en presencia de P1F6, ascites anti- $\alpha V\beta 5$  durante 30 minutos, luego se añadió a placas recubiertas con

25

vitronectina durante 45 minutos. Células de M21 no ligadas fueron retiradas con dos lavados de pozo de 150  $\mu$ 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 del título de la célula a base de  
10 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 en triplicado.

15

Las figuras 4A-D muestran gráficas que se une a  $\forall V\exists 3$  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, 37EC. Mezclas agregadas a placas  
20 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 fueron probadas con macho cabrío anti-ratón IgG Fc, HRP de cabra con anti-humano IgG Fc, HRP de cabra.

25 Las figuras 4E-G muestran gráficas que se une a  $\forall V\exists 5$  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  $\text{Ca}^{++}$ ) o con 1% de BSA-HBSS (con  $\text{Ca}^{++}$ ) durante 30 minutos,  $37^{\circ}\text{C}$ . Mezclas agregadas a placas recubiertas con CNTO 95, C372, c7E3 IgG e incubadas durante 1 hora, a  $37^{\circ}\text{C}$ . VNR139 fue agregado a 10: g/mL es buffer apropiado (+/-  $\text{Ca}^{++}$ ) durante 30 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las placas fueron probadas con macho cabrío anti-ratón IgG Fc, HRP, de cabra.

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  $\alpha\text{V}\beta 3$ .

10

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

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 fueron recubiertas con una capa adherente dos días antes del experimento, y con  $1 \times 10^5$  células/pozo en el momento del estudio. El  $^{125}\text{I}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ . Se determinó agente de 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 triplicadas.

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  $1 \times 10^5$  células/pozo en el momento del estudio. Se agregó  $^{125}\text{I}$ -

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 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.

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.

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 vehículo de control, 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 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).

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

5 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  $\mu\text{g/ml}$ ).

10

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. Adhesión de células a pozos recubiertos con BSA como un control negativo. La Figura 13, el  
15 grado de adhesión de células en presencia de diferentes concentraciones de anticerupo 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 determinaciones por triplicado (+/- SD).

20 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  
25 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 (+/- SD).

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 (+/- SD).

Figura 16 A-D. Migración de HUVECS hacia vitronectina 2  $\mu\text{g/ml}$ . El ensayo fue llevado a cabo según se describió en Métodos y las células 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 µg/ml.

5

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 migración de células en presencia de LM609, P1F6, combinación 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 µg/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),  
10 GenO95 (5 µg/ml), y Figura 18(E), GenO95 (20 µg/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 transpozo (+/- SD).  
15

Figura 19 A-E. Migración de células A375S.2 hacia 10% de FBS. El ensayo  
20 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 µg/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,  
25 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 transpozo (+/-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 µg/ml), y Figura 19(E), GenO95 (20 µg/ml).

5

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 µg/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 2 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 µg/ml); Figura 20(C), GenO95 (40 µg/ml); Figura 20(D), no-bFGF. La Figura 20(E), inhibición de migración de células en presencia de varios anticuerpos se muestra gráficamente.

10

15

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 µg/ml), Figura 21(C) y (D) son representación gráfica de invasión de células en presencia de GenO95, 10E5 F(ab')<sub>2</sub>, 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 µg/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

25

## 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 misma, o al menos una porción de un receptor integrin dual o proteína ligante, la cual puede ser incorporada dentro de un anticuerpo de la presente 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

5 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

10 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

15 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 pepsina y reducción

20 parcial), y F(ab')<sub>2</sub> (por ejemplo por digestión de pepsina), facb (por ejemplo, mediante digestión de plasmina), pFc' (por 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,

25 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 una variedad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpo en los cuales uno o más codones de  
5 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 región de charnela de la cadena pesada. Las diferentes porciones de anticuerpos pueden ser unidas químicamente entre sí  
10 mediante técnicas convencionales, o pueden ser preparadas como una proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética.

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  
15 sustancialmente no inmunogénica en humanos, solamente con cambios menores de secuencia o variaciones. De manera similar, anticuerpos designados primate (mono, primates del género papio, chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, uña de guinea, hamster y similares) y otros animales designan tales anticuerpos  
20 específicos de especies, sub-género, género, sub-familia, familia. Adicionalmente, anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. 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  
25 anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido mediante un animal no humano o 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 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.

10

Anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares también pueden ser utilizados que son monoclonales, de preferencia humanos o humanizados, anticuerpos que tiene especificidades de ligadura para por lo menos dos antígenos diferentes. En el caso presente, una de las especificidades de ligadura es por lo menos una proteína integrin 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,

15

20

25

23

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  
5 colaboradores, EMBO J. 10:3655 (1991), Suresch y colaboradores, Métodos en Enzimología 121:210 (1986), cada una incorporada aquí completamente por vía de referencia.

Anticuerpos de integrin anti-duales (designados también anticuerpos de  
10 integrin duales) útiles en los métodos y composiciones de la presente invención opcionalmente pueden ser caracterizados por alta afinidad que une a integrin dual y opcionalmente y de preferencia que tienen baja toxicidad. En particular, un anticuerpo, fragmento especificado o variante de la invención, en donde los componentes individuales, tales como la región variable, la región constante y la  
15 estructura, individualmente y/o colectivamente, poseen individualmente y de preferencia baja inmunogenicidad, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que 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.  
20 Inmunogenicidad baja o aceptable y/o alta afinidad, así como también otras propiedades adecuadas puede contribuir a los resultados terapéuticos logrados. "Baja inmunogenicidad" es definida aquí como levantando respuestas HAHA, HACA o HAMA significativas en menos de aproximadamente 75%, o preferentemente menos de aproximadamente 50% de los pacientes tratados y/o  
25 elevando bajos títulos en el paciente tratado (menos de aproximadamente 300, de preferencia, menos de aproximadamente 100 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*

5            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 humanos), para diagnosticar, monitorear, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de,  
10            o reducir los síntomas de, al menos una condición 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.

15

          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 reducción en síntomas,  
20            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 µg/ml de concentración de suero por individuo, múltiple o administración continua, o cualquier intervalo o valor efectivo en el mismo, según se hace y se  
25            determina utilizando métodos conocidos, según aquí se describe o se conoce en las técnicas pertinentes.

### *Citaciones*

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  
5 capacitación de la presente invención. Las publicaciones se refieren a cualesquier publicaciones científicas o de patentes, o cualquier otra información disponible en cualquier formato de medio, incluyendo todos los formatos registrados, electrónicos o impresos. Las siguientes referencias son completamente incorporadas aquí por referencia: Ausubel, y colaboradores, ed., Current Protocols  
10 in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>da</sup> Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Habor, NY (1989); Colligan y colaboradores, eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan y colaboradores,  
15 Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, 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 mixta,  
20 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<sup>da</sup> Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory  
25 Manual, Cold Spring Habor, 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 una incorporada aquí enteramente por vía de referencia.

Anticuerpos humanos que son específicos para proteínas integrin humanas  
5 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  
10 producción de anticuerpos monoclonales pueden ser llevadas a cabo utilizando  
cualquier técnica adecuada.

En un enfoque, un hibridoma es producido utilizando una línea celular  
adecuada inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero no  
15 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, MLA 144,  
NAMAIWA, 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  
20 otra línea celular adecuada según se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo,  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com), y similares, con células de producción de  
anticuerpos, tales como, pero no están limitados a los mismos, bazo aislado o  
clonado, sangre periférica, linfa, amígdala u otras células inmunes o células que  
contengan células B o cualesquier otras células que expresen cadena pesada o  
25 liviana constante o variable o estructura o secuencias de CDR, ya sea como ácido  
nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, viral, bacterial,

algal, procariótico, anfibio, de insecto, de reptil, pescado, de mamífero, 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, 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 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 (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 ejemplo, ELISA).

Otros métodos adecuados de producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida pueden ser utilizados, incluyendo, pero no limitados a ellos, métodos que seleccionan anticuerpo recombinante desde una librería de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no están limitados a, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleotido, 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, 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; 5 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, 5817483, 5824514, 10 5976862, WO86/05803, EP 590 689 (Ixsys; ahora Applied Molecular Evolution (AME), cada una incorporada aquí completamente por vía de referneceia) o que confían en inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen y colaboradores, Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu y colaboradores, Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren y colaboradores, 15 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 técnica y/o según aquí se describe. Tales técnicas incluyen, pero no están limitadas a esto, exhibición de ribosoma ( Hanes y colaboradores; Proc. Natl. 20 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. 25 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)).

Métodos para ingeniería o humanización de anticuerpos no humanos 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 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 conocidas son expuestas, por ejemplo,

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;                      www.atcc.org/phage/hdb.html;  
 www.sciquest.com/;                                                      www.abcam.com/;  
 www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;  
 www.public.iastate.edu/~pedro/research\_tools.html;                      www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;                      www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;  
 www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;  
 www.hhmi.org/grants/lectures/1996/viab/;  
 www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;                      www.antibodyresource.com/;  
 mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;                      www.immunologylink.com/;  
 pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;                      www.biotech.ufl.edu/~hcl/;

- [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html); [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/);  
[www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html); [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp);  
[www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html); [www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html);  
[www.isac.net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac.net.org/sites_geo.html); [aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html](http://aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html);  
5 [baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html); [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/);  
[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html); [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/);  
[www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html); [antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/);  
[abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);  
10 [www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html);  
[www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/); [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm);  
[www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html);  
[www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html);  
15 [www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html);  
[www.jerini.de/fr\\_products.htm](http://www.jerini.de/fr_products.htm); [www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat y  
colaboradores, Sequences of Proteins of immunological Interest, U.S. Dept. Health  
(1983), cada una incorporada aquí completamente por vía de referencia.

- 20 Tales secuencias importadas pueden ser utilizadas para reducir  
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  
25 secuencias no humanas de regiones variables y 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 y diferentes productos humanizados conceptuales que

5 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 computador se encuentran disponibles los cuales ilustran y exhiben estructuras probables conformacionales de tres dimensiones de secuencias seleccionadas

10 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

15 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

20 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); Verhoeven 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.

25 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  
5 incorporada aquí por vía de referencia, incluidas las referencias citadas aquí.

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  
10 repertorio de anticuerpos humanos, según aquí se describe y/o 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.

15 Ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de 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;  
20 Jakobovits y colaboradores WO 98/50433, 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  
25 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. Immunol.*  
6(4):579-591 (1994), green y colaboradores, *nature Genetics* 7:13-21 (1994),  
Mendez y colaboradores, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Taylor y  
5 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 encuentran completamente  
incorporados aquí por vía de referencia). En general, estos ratones comprenden al  
10 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  
pueden ser desorganizados o suprimidos para eliminar la capacidad del animal  
para producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

15

Cribado de anticuerpo para ligamiento específico a proteínas o fragmentos  
similares puede ser logrado convenientemente utilizando 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  
20 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 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  
25 librerías de péptidos, varios métodos de ADN recombinante han sido descritos. Un  
tipo implica la exhibición de una secuencia de péptidos sobre la superficie de un

bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia 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 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 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 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.

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 cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Tales animales pueden ser provistos utilizando métodos 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.

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 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 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 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 de cadena sencilla (scFV's), que incluyen semillas de tabaco y tubérculos de papa. Véase, por ejemplo, Conrad y colaboradores, Plant Mol. Biol. 38:101-109 (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. 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.

- 5 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
- 10 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.

- La afinidad o aidez de un anticuerpo por un antígeno puede ser determinada experimentalmente utilizando cualquier método adecuado. (Véase,
- 15 por ejemplo, Berzofsky y colaboradores, "Antibody-Antigen Interactions", en *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed. Raven Press: nueva York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W.H: Freeman y 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
- 20 ejemplo, concentración de sal, pH). De esta manera, las medidas de afinidad y otros parámetros que unen antígeno (por ejemplo,  $K_D$ ,  $K_2$ ,  $K_d$ ) 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

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, 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 la forma de ARN, tales como mRNA, 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 hebra o de hebra sencilla, o cualquier combinación de las mismas. Cualquier porción de por lo menos una hebra del ADN o ARN puede ser la hebra 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 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); 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 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. 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 limitativos de ácido nucleico que codifica, respectivamente HC CDR1, HC 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 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. \_\_\_\_\_, 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 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

5 guiador de señal o péptido de fusión, con o sin 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 transcripción, el procesamiento de mRNA, que incluye

10 señales de empalme y señales de poliadenilación (por ejemplo – ribosoma de unión y estabilidad 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 secuencia

15 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**

20 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 presente invención pueden ser

25 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.

De preferencia, la librería de cADN comprende por lo menos 80% de  
5 secuencias de longitud completa, de preferencia por lo menos 85% o 90% de secuencias de longitud completa, y con mayor preferencia por lo menos 95% de secuencias de longitud completa. Las librerías de cADN pueden ser normalizadas para incrementar la representación de secuencias raras. Bajas o moderadas condiciones de hibridación de severidad son típicamente, pero no exclusivamente,  
10 empleadas con secuencias que tienen una identidad reducida de secuencia con relación a secuencias complementarias. Condiciones de severidad moderadas y altas pueden ser empleadas 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  
15 para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

Opcionalmente, polinucleótidos de esta invención condificarán 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  
20 pueden ser empleadas para hibridización selectiva a un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Véase, 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 utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de las mismas, como bien conocidas en el arte.

5

Los ácidos nucleicos pueden comprender convenientemente secuencias en adición a un polinucleótido de la presente invención. Por 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 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 polinucleótido de la presente invención.

10

15

20

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 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).

### **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 número de metodologías de clonación conocidas para aquellos de experiencia en la técnica. En algunas modalidades, pruebas de 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 tornen 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 intervalo de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerido para ligamento detectable variará de acuerdo con la severidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. El grado de complementariedad será  
5 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 reduciendo la severidad de la hibridización y/o medio de lavado.

10 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 presentados.

15 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 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  
20 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 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  
25 síntesis de ADN de doble trenzado (Patente estadounidense No. 5.130.238 otorgada a Malek y colaboradores, con el nombre registrado NASBA), los

contenidos 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) puede  
5 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 ácidos nucleicos para usarse como  
10 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 Mullis y colaboradores, Patente estadounidense No.  
15 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).  
Adicionalmente, por ejemplo, el gen T4 proteína 32 (Boehringer Mannheim) puede  
20 ser utilizado para mejorar el rendimiento de productos largos de PCR.

#### **Métodos Sintéticos para Construir Ácidos Nucleicos**

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también pueden ser  
preparados mediante síntesis química directa por métodos conocidos (véase, por  
25 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

5 100 o más bases, secuencias más largas pueden ser obtenidas mediante la ligación de secuencias más cortas.

### **Cartuchos de Expresión Recombinante**

La presente invención proporciona adicionalmente cartuchos de expresión recombinante que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Una

10 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

15 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 expresión de los ácidos nucleicos de la presente invención.

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

25 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.

### **Vectores y células huésped**

5           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;  
10 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,  
15 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 apropiada de células de empaque y luego convertidas en células huésped.

20           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 codificadora de las copias acabadas expresada por las construcciones incluirá de preferencia una traducción que se  
25 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.

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. 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 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 introducción de una construcción de vector, dentro de una célula huésped puede ser efectuada mediante transferencia de fosfato de calcio, 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, 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 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 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 muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Sambrook, supra, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, supra, capítulos 16, 17, y 18.

10

Aquellos de experiencia ordinaria en la materia están bien informados de los numerosos sistemas de expresión disponibles para expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención.

15

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.

20

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

25

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](http://www.atcc.org)). Células huésped preferidas incluyen células de origen linfóide, tales como células mieloma y linfoma. Células huésped particularmente preferidas son P3X63Ag8.653 (ATCC Número de Acceso CRL-1580), y células SP2/0-Ag14 (ATCC Número de Acceso CRL-1851). En una modalidad particularmente preferida, la células recombinante es una célula P3X63Ab8.653, ó una célula SP2/0-Ag14.

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. 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. 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 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](http://www.atcc.org)) u otras fuentes comerciales conocidas.

- 5 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 la secuencia de poliadenilación desde el germen de hormona de crecimiento de bovinos. Secuencias para el empalme exacto del transcriptor también pueden ser incluidas.
- 10 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 en la técnica.

## 15 **Purificación de un anticuerpo**

- Una anticuerpo de integrin anti-dual puede ser recuperado y purificado desde cultivos de células recombinantes mediante métodos suficientemente 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. 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
- 25

Anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos químicos sintéticos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes desde un huésped eucariótico, que incluye, por ejemplo, levadura, planta más elevada, células de insectos y mamíferos. Según el huésped utilizado en un procedimiento de producción por recombinate, 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 la 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 une 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, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% o más según el ensayo. La capacidad de un anticuerpo de integrin 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,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ) 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.

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

al menos 1-3 aminoácidos a la porción especificada de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NOS: 9, 16 ó 17.

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 secuencia de aminoácidos de la correspondiente CDR de por lo menos uno de mAb Gen095, Gen0101, CNT095, C372A, tal y como aquí se describió. 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 técnicas convencionales de tecnología recombinante de ADN o utilizando cualquier otro método adecuado.

5

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 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

10 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: 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,

15 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 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

20 lugar de cadena liviana de inmunoglobulina humana que puede sufrir arreglo funcional, puede ser inmunizado con integrin dual humano o un fragmento del mismo para sacar la producción de anticuerpos. Si se desea, las células de producción de anticuerpos pueden ser aisladas e hibridomas u otras células que producen anticuerpos inmortalizados pueden ser preparadas como se describió

25 aquí y/o como se sabe en el arte. Alternativamente, el anticuerpo, porción

especificada 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  
5 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  
10 aproximadamente  $10^{-9}$  M). Secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales tales como las secuencias aquí descritas incluyen secuencias que comprenden substituciones 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  
15 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), serina (S), treonina (T), tirosina (Y),  
20 K, R, H, D y E; alanina (A), valina (M), 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**

25 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 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            |
| Q                        | Gln                   | Glutamina       | CAA, CAG                      |
| 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                      |

Un 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.

5 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  
10 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 de sitio o mutagénesis de exploración de alanina (por ejemplo, Ausubel, supra, capítulos 8,15; Cunningham y Wells, Ciencia 244:1081-1085 (1989)). 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  
15 dual. Sitios que son críticos para 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)).  
20

25 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.

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

En una modalidad, la secuencia de aminoácido de una cadena de inmunoglobulina, o preparación de la misma (por ejemplo, la región variable, CDR)  
10 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 la serie) a la secuencia de aminoácidos de la cadena correspondiente de al menos una de SEQ ID NOS: 7,8. Por ejemplo, la secuencia de aminoácido de una región variable de cadena liviana  
15 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  
20 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  
25 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 5 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 invención incluye por lo menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención, Anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad 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 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 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. 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 comprender desde cerca de 8 hasta  
5 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 covalentemente unidas, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada porción  
10 orgánica que está unida a un anticuerpo o fragmento que une 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 se utiliza aquí, se refiere a un  
15 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 e incluyen, por ejemplo, glicoles de polialcano  
20 (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 polialquilenos (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinil pirrolidona. De  
25 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 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.

- 5 Polímeros hidrofílicos que son sustituidos con un ácido graso o grupo éster de ácido graso puede ser preparado empleando métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo amina puede ser acoplado a un carboxilato del ácido 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
- 10 puede ser acoplado a un grupo hidroxilo en un polímero.

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

15 modificantes de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C12, laurato), n-tetradecanoato (C14, miristato), n-octadecanoato (C18, estearato), n-eicosanoato (C20, araquidato), n-docosanoato (C22, behenato), n-triacontanoato (C30), n-tetracontanoato (C40), cis- $\Delta^9$ -octadecanoato (C18, oleato), todo cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -eicosatetraenoato (C20, araquidonato), ácido octanedióico, ácido

20 tetradecanedióico, ácido octadecanedióico, ácido docosanedióico y 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.

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 modificante" tal como el término se usa en la presente, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrofílico, un ácido graso, un 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 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-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 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 por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Porciones ligadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, tetraetilén glicol, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH- y -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-O- CH<sub>2</sub>-NH-. Agentes modificadores que comprenden una porción ligadora pueden

ser producidos, por ejemplo, haciendo reaccionar una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilenediamina, mono-Boc-diaminohexano) con un 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 orgánica que está unida a sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención pueden ser preparados utilizando métodos adecuados, tales como 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 colaboradores,  
Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)), y los métodos descritos en  
5 Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA  
(1996).

### **ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO PARA COMPOSICIONES DE ANTICUERPO DE INTEGRIN ANTI-DUAL**

10 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 general asociados con la región  
que liga antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede ser preparado inmunizando  
15 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 anticuerpo inmunizante y producen un anticuerpo anti-Id. El  
anticuerpo anti-Id puede también ser utilizado como un "inmunógeno" para inducir  
20 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  
25 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 líquida o secas, mezclas, suspensiones, emulsiones o coloides según se conoce en la técnica o según aquí se describió.

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 hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), un  
5 relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anetítico 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  
10 ejemplo, epoetin alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostin (GM-CSF, Leucina), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por 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  
20 antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un agente antimánico, un antipsicótico, un ansiolítico, 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, dornasa alfa, (pulmozyme),  
25 una citoquina o un antagonista o anticuerpo de citoquina. 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 (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket  
5 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 de  
10 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 ser, pero no están limitada a, toxina purificada o recombinante o fragmento de toxina que  
15 comprende por lo menos un dominio de toxina de citotóxico 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 que puedan causar cualesquier condición patológica  
20 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 choque tóxico (TSST-1), enterotoxina A estafilococa (SEA), B (SEB), o C (SEC),  
25 enterotoxinas estreptococales y similares. Tales bacterias incluyen, pero no están limitadas a esto, cepas de una especie de E.Coli (ETEC), enterotoxigénico, E.Coli

enterohemorrágico (por ejemplo, especies de serotipo 0157:H7), especies de estafilococos (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*,  
5 *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies *Camphlobacter* (por ejemplo, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), especies *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), especies *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*),  
10 *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, especies *Vibrios* (por ejemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), especies *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Streptococci*. Véase, por ejemplo, Stein, ed., 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  
15 239-254, Plenum Medical Book Co., Nueva York (1991); Mandell y colaboradores, principles and Practice of 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,  
20 248:705-711 (1990), los contenidos de las cuales son incorporados aquí completamente por vía de referencia.

Compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpos integran anti-  
dual de la presente invención pueden comprender adicionalmente por lo menos  
25 uno de cualquier auxiliar adecuado, tales como, pero no limitados a, 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 Sciences, 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 anti-dual como bien conocidos en el arte o según aquí se describe.

10

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- tetra-, 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.

25

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 alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Excipientes  
5 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  
10 partir de un ácido o base orgánica. Buffers representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico; tris, hidrocloreuro de trometamina, o buffers de fosfato. Buffers preferidos para uso en las presentes composiciones son sales de ácido orgánico tales como  
15 citrato.

Adicionalmente, composiciones de anticuerpos integrin anti-dual de la invención pueden incluir excipientes / aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, fícoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo,  
20 ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), polietilén glicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobiales, endulzantes, antioxidantes, 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).

25

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 Science & Practice of Pharmacy", 19va edición, Williams & Williams, (1995), y en "Physician's Desk Reference", 52va edición, medical Economics, 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.

### 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 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 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 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, 0,05, 0,09, 0,01, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, o cualquier intervalo o valor dentro 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%), 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.

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 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 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 un período de 24 horas o mayor.

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  $\mu$ 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 bencílico, 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 fácilmente determinadas por el artesano experimentado.

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), Plurónico 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 particularmente útiles si una bomba o un recipiente de plástico es utilizado para administrar la formulación. La presencia de mitigantes de agente activo de superficie farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión de la proteína para agregarse.

Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse 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 mismos en un diluyente acuoso. La operación de

5 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 combinado con el preservativo deseado en una solución convertida en buffer en

10 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 adicionales, la temperatura y el pH a los cuales la formulación es preparada, son todos factores

15 que pueden ser optimizados para la concentración y medios de administración utilizados.

Las fórmulas reivindicadas pueden ser provistas a pacientes como soluciones claras o como botellitas duales que comprenden una botellita de

20 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

25 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.

Los presentes artículos de manufactura reivindicados son útiles para  
5 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 temperaturas desde aproximadamente  
10 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 etiqueta puede incluir uso hasta de 1-12 meses, la mitad, uno y medio, y/o dos años.

15

Las soluciones de al menos un anticuerpo integrin anti-dual en la invención puede ser preparada mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. La operación de mezcla es llevada a cabo utilizando dilución y procedimientos de mezcla convencionales. Para preparar un  
20 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  
25 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  
5 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  
10 tratamiento del paciente y de esta manera provee un régimen de tratamiento más conveniente que el actualmente disponible.

El producto reivindicado puede ser provisto indirectamente a pacientes suministrando a farmacias, clínicas, u otras de tales instituciones y facilidades,  
15 soluciones claras o botellitas duales que comprenden una botellita de liofilizado a al menos un anticuerpo de integrin anti-dual que es reconstituido con una segunda botellita que contiene el diluyente acuoso. La 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  
20 anticuerpo puede ser recuperada una o múltiples veces para transferir dentro de botellitas más pequeñas y provistas por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

Dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de botellita  
25 sencilla incluyen aquellos dispositivos de depósito inyector para suministro de una solución tal como BD pens, BD Autojector®, Humaject®, Novopen®, 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 Dickensen (Franklin Lakes, NJ, [www.bectondickenson.com](http://www.bectondickenson.com)), Disetronic (Burgdorf, Suiza, [www.disetronic.com](http://www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon ([www.bioject.com](http://www.bioject.com)); National Medical Products, Weston medical (peterborough, UK, [www.weston-medical.com](http://www.weston-medical.com)), Medi-ject Corp (Minneapolis, MN, [www.mediject.com](http://www.mediject.com)). Dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de botellita dual incluyen aquellos sistemas de depósito inyector para reconstituir una droga liofilizada en un cartucho para suministro de la solución reconstituida tal como la HumatroPen®.

Los productos actualmente reivindicados incluyen material de empaque. El material de empaque provee, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones bajo las cuales 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 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 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 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  
5 deseadas. Variaciones de este proceso serían reconocidas por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, el orden 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.

10

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  
15 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.

20

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  
25 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.

### **Aplicaciones terapéuticas**

5           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 se describe, utilizando al menos un anticuerpo de integrin dual de la presente invención.

10           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  
15   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  
20   artritis reumatoide, artritis juvenil reumatoide, artritis reumatoide juvenil de ataque sistémico, artritis soriática, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías senonegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, eritematosis sistemática de lupus, síndrome antifosfolípido, neuritis iridocillitis/uveitis/óptica, fibrosis pulmonar idiopática, granulomatosis sistémica  
25   vasculitis/wegener, sarcoidosis, procedimientos de orquitis/vasectomía inversos, enfermedades alérgicas/ópticas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis de

contacto alérgico, conjuntivitis alérgica, neumonitis de hipersensitividad, transplantes, rechazo de órgano de transplante, enfermedad de injerto-contrahuésped, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis gram positiva, sepsis gram negativa, sepsis negativa de cultivo, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococcemia, trauma/hemorragia, quemaduras, exposición a 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 hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenial, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxis 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 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 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, miastemia gravis, citotoxicidad por medio de anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, 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 Addison, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiectomía post-MI, hipersensibilidad tipo IV, 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 Hashimoto, osteoporosis, evaluación de eje hipotalámico-pituitario-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomielitis, cachexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), linfocitosis, hemofagocítica familiar, condiciones dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis 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, 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.

20

La presente invención provee también un método para modular o 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 miocárdica, falla congestiva del corazón, apoplejía, apoplejía isquémica, hemorragia, arterioesclerosis, arterioesclerosis, restenosis, enfermedad arterioesclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial,

25

hipertensión renovascular, síncope, 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

5 cardiopulmonar, 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, cardiomiopatía restrictiva,

10 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, tromboangitis obliterans, desórdenes funcionales

15 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 similares. Tal método opcionalmente puede comprender administrar una cantidad efectiva de

20 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

25 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, epiglotitis, e.coli 0157:h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura  
5 trombocitopénica trombolítica, 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  
10 hemafagocítico vital asociado, meningitis vital encefalitis/aséptica, y enfermedades similares.

La presente invención también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o  
15 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-  
20 Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorectal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome/hipercalcemia paraneoplástico de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastática, cáncer relacionado con resorción de huesos, cáncer relacionado con  
25 dolor de huesos y enfermedades similares.

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 hiperkinético, 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 Friedreich, 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 de núcleo demielinante, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda; y desórdenes de la unidad motriz tales como atrofi as musculares 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 Hallerrorden-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).

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 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 después, por lo menos uno seleccionado entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no está limitado a un anticuerpo de TNF 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 hidroxiclороquina, 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 cicloplégico, 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 inhibidor de luecotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, alfa dormasa (Pulmozima), una citoquina o un antagonista de 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, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), cada una de tales referencias está completamente aquí incorporada por vía de referencia.

20

Antagonistas TNF adecuados para composiciones, terapia de combinación, co-administración, dispositivos y/o métodos de la presente 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,

25



liberación de TNF o 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

5 TNF, tales como proteína activada con mitógeno (MAP) inhibidores de quinasa; compuestos que bloquean y/o inhiben división TNF de membrana, tales como inhibidores de metaloproteínasa; 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 y/o propulsión y/o síntesis de

10 TNF, tales como inhibidores de quinasa MAP.

Tal como aquí se usa, un "anticuerpo de factor de necrosis de tumor", "anticuerpo de TNF", "anticuerpo  $\text{TNF}\alpha$ ", o fragmento y similares disminuye, bloquea, inhibe, abroga o interfiere con la actividad de  $\text{TNF}\alpha$  in vitro, in situ y/o de

15 preferencia in vivo. Por ejemplo, un anticuerpo humano de TNF adecuado de la presente invención pueden unir  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$ . Un anticuerpo o fragmento adecuado de TNF también puede disminuir bloqueo, abrogar, interferir,

20 evitar y/o inhibir TNF ARN, ADN o 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

25 variable del anticuerpo  $\text{TNF}\alpha$  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 fator de anticuerpo halogenéico, aumenta la vida media de suero circulante y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidez y especificidad epítipo del anticuerpo quimérico cA2 es derivada de la región variable del anticuerpo de murina A2. En  
5 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  $\text{TNF}\alpha$   
10 tanto natural como humano recombinante en una manera dependiente de la dosis. A partir de ensayos de ligazón de anticuerpo quimérico cA2, y  $\text{TNF}\alpha$  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  
15 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.,  
20 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  
25 producido por una línea celular designada c134A. El anticuerpo quimérico cA2 es producido por una línea designada c168A.

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, Cytokine 2(3):162-169 (1990); solicitud estadounidense No. 07/943.852 (presentada el 11 de septiembre de 1992); Rathjen 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 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 vía de referencia.

15

### **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 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 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

25

ejemplo, Corcoran y colaboradores, Eur. J. Biochem. 223:831-840 (1994)), también son útiles en la presente invención. Formas truncadas de los receptores TNF, que comprenden el ECD, han sido detectadas en la orina y el suero como proteínas inhibitorias que unen 30 kDa y 40 kDa TNF $\alpha$  (Engelmann, H. y  
5 colaboradores, J. Biol. Chem. 265:1531-1536 (1990)). Moléculas multiméricas receptoras de TNF y moléculas de fusión 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  
10 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.

15 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  
20 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.

25 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 homo- mutímeros. Las moléculas de fusión de inmunoreceptores pueden ser monovalentes o multivalentes. Un ejemplo

5 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.

10 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

15 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

20 completa por vía de referencia.

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

25 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  $\text{TNF}\alpha$  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

5 (por ejemplo, ligar  $\text{TNF}\alpha$  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

10 hidrofóbico por otro codón que codifica un aminoácido hidrofóbico). Véase Ausubel y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Assoc., y Wiley- Interscience, Nueva York (1987-2000).

Citoquinas incluyen cualquier citoquina conocida. Véase, por ejemplo,

15 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**

20 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

25 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

5 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 hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un

10 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 esteroide anabólico, un

15 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

20 inmunosupresivo (por ejemplo, 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

25 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.

Típicamente, el tratamiento de condiciones patológicas es efectuado  
5 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 de preferencia desde al menos aproximadamente 0,1 hasta 100 miligramos de anticuerpo por kilogramo de  
10 paciente por administración simple o administración múltiple, dependiendo de la actividad específica contenida en la composición. Alternativamente, la concentración efectiva de suero puede comprende 0,1-5000 µg/ml de concentración de suero por administración sencilla o múltiple. Dosificaciones adecuadas son conocidas para los practicantes médicos y, naturalmente, dependerán del estado de la enfermedad particular, actividad específica de la  
15 composición que es administrada, y del paciente particular que está bajo tratamiento. En algunos casos, para lograr la cantidad terapéutica deseada puede ser necesario proveer para administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis particular monitoreada o medida, en donde las  
20 administraciones individuales son repetidas hasta que la dosis diariamente deseada o efectuada sea lograda.

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,  
25 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66,

67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier intervalo, valor o fracción de 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, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 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, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, y/o 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.

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 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.

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 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  
5 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, 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, o 52, o alternativamente o adicionalmente, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 años, o cualquier combinación de los mismos,  
10 utilizando dosis sencilla, infusión o dosis repetidas.

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  
15 farmacéuticas el ingrediente activo ordinariamente estará presente en una cantidad de aproximadamente 0,5-99.999% en peso con base en el peso total de la composición.

Para administración parenteral, el anticuerpo puede ser formulado como  
20 una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación, o provisto separadamente, con un vehículo parenteral farmacéuticamente 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  
25 vehículo o polvo liofilizado pueden contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y 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 reciente  
5 de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo.

### **Administración Alternativa**

Muchos modelos conocidos y desarrollados pueden ser utilizados de  
10 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.

15

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  
20 modos descritos aquí o dentro de la técnica conocida.

### **Formulaciones Parenterales y Administración**

Formulaciones para administración parenteral pueden contener como  
excipiente comunes agua estéril o salina, polialquilén glicoles, tales como glicol de  
25 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 diluyendo el agente tal como solución acuosa o una solución o suspensión en un solvente inyectable estéril.

- 5 Como el vehículo o solvente utilizable 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-  
10 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  
15 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,  
20 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,  
25 intravesicales, bolo, vaginales, rectales, bucales, sublinguales, intranasales, o transdérmicos. Al menos una composición de anticuerpo integrin anti-dual puede

ser preparada para uso para administración parenteral (subcutánea, intramuscular, o intravenosa) o cualquier otra clase de administración 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 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 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 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 completamente incorporadas aquí por vía de referencia).

#### **Administración pulmonar/nasal**

Para administración pulmonar, de preferencia, al menos una composición de anticuerpo integrin anti-dual es suministrada en un tamaño de partícula efectivo para alcanzar las vías de aire inferiores del pulmón o 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 depositar formaulaciones aerosolizadas en la cavidad de

5 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 pueden usar formulaciones adecuadas para la administración por el suministro de un

10 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 durante la inspiración (véase, por ejemplo, Wo 94/16970, WO 98/35888). Inhaladores de polvo seco como Turbuhaler™

15 (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 estadounidense 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, incorporados aquí

20 completamente por vía de referencia). Nebulizadores como AERx™ Aradigm, el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 de Aradigm, WO 97/22376), las referencias anteriores incorporadas aquí completamente por vía de referencia, producen aerosoles a partir de soluciones, en tanto que lo inhaladores de dosis medida,

25 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  $\mu\text{m}$  de preferencia aproximadamente de 1-5  $\mu\text{m}$  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 deseada y el tamaño de partículas. Un electrorocío puede ser producido, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con una alimentación 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  $\mu\text{m}$  de preferencia dentro del intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , y con mayor preferencia de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ .

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

5 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

10 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

15 composición de anticuerpos, incluyen albúmina, protamina o similares. Carbohidratos típicos útiles en la formulación de proteínas de composición de anticuerpos incluyen sucrosa, manitol, lactosa, trealosa, glucosa, o compuestos similares. La fórmula de proteínas de composición de anticuerpos puede incluir un agente activo de superficie, el cual puede reducir o prevenir agregación

20 inducida de superficie de la 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.

25 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 formulación.

5    **Administración de composiciones de anticuerpos de integrin dual mediante un nebulizador**

La composición de anticuerpos proteínas puede ser administrada mediante un nebulizador, tal como nebulizador de chorro, o un nebulizador ultrasónico. Típicamente, en un nebulizador de chorro, una fuente de aire comprimido es  
10 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 boquilla, es creada una región de baja presión, la cual arrastra una solución de proteínas de composición de anticuerpos a través de un tubo capilar conectado a un recipiente de líquido. La corriente de líquido proveniente del tubo capilar es cizallada en filamentos y  
15 goticas 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  
20 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  
25 aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de preferencia dentro del intervalo de aproximadamente

1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , y más preferentemente aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  hasta alrededor de 3  $\mu\text{m}$ .

Formulaciones de al menos un anticuerpo de integrin anti-dual adecuado  
5 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,  
10 zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para estabilización de la al menos una 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,  
15 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  
20 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 sorbital de polietileno. Las cantidades variarán en general entre 0,001 y 4% en peso de la formulación. Agentes activos de superficie especialmente preferidos  
25 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.

### **Administración de composiciones de anticuerpo integrin dual por un**

#### **5 inhalador de dosis medida**

En un inhalador de dosis medida (MDI), un propulsor, al menos un anticuerpo integrin anti-dual, y cualesquier excipiente u otros aditivos son contenidos en una lata pequeña como una mezcla que incluye un gas comprimido licuado. Actuación de la válvula medidora pone en libertad la mezcla, como un  
10 aerosol, de preferencia, partículas que contienen en el intervalo de tamaño de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de preferencia aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hasta alrededor de 5  $\mu\text{m}$  y más preferentemente de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  hasta alrededor de 3  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula del aerosol deseado puede ser obtenido empleando una formulación de composición de anticuerpos de proteína producida  
15 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.

20

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  
25 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, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano 134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o semejantes. De preferencia el  
5 propulsor es un 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 soya, ácido oléico, o similares. En algunos casos soluciones de aerosoles son preferidas  
10 usando solventes tales como etanol. Agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína también pueden ser incluidos en la formulación.

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

### **Formulaciones orales y administración**

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

un aditivo, que incluye sucrosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, 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  
5 contener otro tipo o tipos de aditivos, por ejemplo, agente de dilución 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 preparaciones pueden contener  
15 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 (proteínoides) han sido utilizados para suministrar  
20 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 activos oralmente son conocidos en el arte.

### **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  
5 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 corneales, conjuntivales, bucales,  
10 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,  
15 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 liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartículas, microcápsula, o microesferas (designadas colectivamente como micropartículas a menos que se indique otra  
25 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**

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 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; (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-etilenediamina o de etilenediamina; o (c) combinaciones de (a) y (b) por ejemplo una sal de tanato de zinc. Adicionalmente, los compuestos de la 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 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 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, 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 fácilmente entendida mediante referencia a los ejemplos siguientes, los cuales se suministran por vía de ilustración y no son incluidos como limitantes.

#### **Ejemplo 1: Clonación y expresión de anticuerpo integrin dual en células de mamíferos**

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. 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 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

5 presente invención, incluye, por ejemplo, vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, o pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), 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

10 utilizadas incluyen células Hela 293 humano, células H9 y Jurkat, células NIH3T3 de ratón, y células C127, células Cos 1, Cos 7, y CV 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 estables

15 que contienen el gen integrado dentro de un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina, o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado también puede ser amplificado para expresar grandes

20 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 colaboradores, Bio/Technology 10:169-175

25 (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 frecuentemente para la producción de anticuerpos.

- 5 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 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
- 10 clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el 3' intron, la señal de poliadenilación y terminación del gen de rata de preproinsulina.

### **Clonación y expresión en células CHO**

- El vector pC4 es utilizado para la expresión del anticuerpo integrin dual. El
- 15 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,
- 20 Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementados con el agente quimoterapéutico 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.
- 25 Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991)). Células desarrolladas en concentraciones en aumento de MTX desarrollan resistencia a la droga

sobreproduciendo 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 promotor e la larga repetición terminal (LTR) del Virus de Sarcoma Rous (Cullen, y colaboradores, *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) mas un 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 HTLVI. 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  
5 desfosforilado utilizando fosfatasa intestinal de ternero mediante procedimientos conocidos en el arte. El vector es aislado luego desde un gel de 1 % de agarosa.

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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 con 1 µg/ml de G418. Después de dos días, las células son tripsilisadas y sembradas en placas clonizantes de hibridoma (Greiner, Alemania) en alfa menos

MEM suplementado con 10, 25, o 50 ng/ml de metotrexato mas 1  $\mu$ g/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días son tripsinizados clones sencillos y luego sembrados en platos petri de seis pozos o en matraces de 10 ml 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)  $F_2$  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 CNTO 95, inhibe la ligazón tanto de  $\alpha V\beta 3$  como de  $\alpha V\beta 5$  a vitronectina en ensayos basados en células.

**Abreviaturas:**

- 5 BSA – albúmina de suero bovino
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EIA – Inmunoensayo de enzima
- FBS – Suero de feto bovino
- 10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrógeno
- HC – Cadena pasada
- HRP – peróxido de rábano picante
- Ig – inmunoglobulina
- IP – intraperitoneal
- 15 IV – Intravenoso
- Mab – Anticuerpo monoclonal
- OD – Densidad óptica
- OPD – Dihidrocloreuro de o-fenilenediamina
- PEG – Polietilén glicol
- 20 PSA – Penicilina, estreptomicina, Amfotericina
- RT – Temperatura ambiente
- SQ – Subcutánea
- TBS – tris buffer salino
- v/v – volumen por volumen
- 25 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 integrins  $\alpha V$ . Estos anticuerpos novedosos pueden ser utilizados terapéuticamente para inhibir el proceso angiogénico bloqueando la unión de integrins  $\alpha V$  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 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  $V_K$  de germalina humana. Además de varios genes VH, el gen de cadena pesada (HC) codifica tanto humanos  $\mu$  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 inmunización y fusión para generar estos anticuerpos monoclonales.

### Purificación de $\alpha V\beta 3$ humano

Placenta humana (rota utilizando un moedor de carne) o células M21 de melanoma humano que expresan el integrin  $\alpha V\beta 3$  fueron extraídas con solución salina que contenía 20 mM tris pH 7.5, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 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 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  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , y 0,1% OTG seguido por acetato de sodio 0.1 M de pH 4,5, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , y 0,1% OTG, pH 3.0. La columna fue extraída con glicina 0,1M, ácido acético al 2%, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 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 spreparaciones fue caracterizada por análisis de SDS-PAGE y ELISA para excluir contaminación GPIIb/IIIa (Wayner, y colaboradores, J. Cell Biol.. 113: 919-929 (1991)).

20

### Inmunizaciones

Un ratón macho castrado quirúrgicamente de 15 a 17 semanas de edad obtenido desde GenPharm fue IP inmunizado (200  $\mu\text{L}$ ) y en 2 sitios SQ (100  $\mu\text{L}$  por sitio) con un total de 20  $\mu\text{g}$  de  $\alpha V\beta 3$  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  $\alpha V\beta 3$

25

emulsificada con un volumen igual de adyuvante de Freund incompleto. Tres inyecciones subsiguientes de 10 µg IP/ 10 µg 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  $\alpha V\beta 3$  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  $\alpha V\beta 3$  fue aplicada una IV inyección de refuerzo final de 10 µg  $\alpha V\beta 3$  diluida en 100 µl 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 µg/mL de estreptomicina, y 0,25 µg/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 suspendido en un medio de RPMI 1640 que contenía 25 mM de Hepes.

### 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  $\alpha$ 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.

5

La línea celular M21, que expresa un melanoma humano, los integrins  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$ , 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  $\alpha V\beta 3$ . La línea celular fue criopreservada en Cell Biology Services. El banco de células era estéril y libre de micoplasma (Bionique Laboratories). Las células M21 y 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).

**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 ( $\alpha$ 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  $\mu$ g/mL de gentamicina, 2,5% de suplemento Origen de cultivo (Fisher), 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, 100  $\mu$ M de hipoxantina, 0,4  $\mu$ M de aminopterina, y 16  $\mu$ M de timidina) y luego se plateó a 200  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub> y 95% de aire durante de 7 – 10 días.

10

#### **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 platos fueron recubiertos con  $\alpha$ V $\beta$ 3 a 1  $\mu$ 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<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, 200  $\mu$ L/pozo durante 1 horas a RT. Los platos fueron usados inmediatamente o congelados a -20°C para uso futuro. Sueros de ratón fueron incubados doblando diluciones en los platos recubiertos de  $\alpha$ V $\beta$ 3 a 50  $\mu$ L/pozo a RT durante 1 hora.

15

Los platos fueron lavados y luego probados con 50  $\mu$ 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  $\mu$ L/pozo de la solución de substrato de citrato-fosfato (0,1M ácido cítrico y 0,2M fosfato de sodio, 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1 mg/mL de OPD) fue agregada durante 15 minutos a RT. Luego se añadió solución de detención (ácido sulfúrico 4N) a 25

25

μL/pozo y se leyeron a 490 nm a través de un espectrofotómetro de placa automatizado.

### **Detección de inmunoglobulinas totalmente humanas en hibridoma flotante**

5        Puesto que el ratón genPharm es capaz de generar cadenas de  
inmunoglobulina tanto de ratón como de humano, hibridomas de crecimiento  
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  
10    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  
15    solución de sustrato según se describió anteriormente.

### **Determinación de isotipos**

La determinación de isotipo de los anticuerpos fue llevada a cabo utilizando  
20    un EIA en un formato similar al utilizado para cernir el suero inmune de ratón para  
títulos específicos. αVβ3 fue recubierto sobre placas de 96 pozos según se  
describió anteriormente y anticuerpo purificado a 2 μg/mL fue incubado sobre la  
placa durante 1 hora a RT. La placa fue lavada y probada con HRP rotulada IgG<sub>1</sub>  
anti-humano de cabra (Sitio de Unión) o rotulado HRP de carba anti-humano IgG<sub>3</sub>  
25    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 mediante

### 5 EIA

Características de unión para los anticuepros 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  $2\text{ mM}$  durante la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Las placas fueron lavadas y bloqueadas con TBA/ BSA al 1%/ calcio durante por lo menos una hora a temperatura ambiente. Anticuepros purificados fueron incubados en diluciones en duplicado desde una concentración de partida de dos  $\mu\text{g/mL}$ . Las placas fueron lavadas y anticuepros 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

20 Células M21 fueron tripisinizadas desde matraces de cultivo, lavadas y vuletas a suspender en HBSS/calcio a  $2 \times 10^6$  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  $20\mu\text{g/mL}$ , fueron incubadas con IgG anti-humano de FITC de cabra a  $2,50\mu\text{g/mL}$ .. Alícuotas de  $100\mu\text{L}$  de 25 células M21 ( $2 \times 10^5$  células) fueron incubadas con  $12\mu\text{L}$  de 10X GenO95 a altas ( $20\mu\text{g/mL}$  final) y bajas ( $2\mu\text{g/mL}$  final) concentraciones  $\pm 12\mu\text{L}$  de los siguientes

anticuerpos de murina: m7E3 IgG, anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 (clon LM609, Chemicon), anti- $\alpha$ V $\beta$ 5 (clon P1F6, Gibco), anti- $\beta$ 3 (Chemicon, AMAC), o anti- $\alpha$ V (clon VNR139, Gibco) anticuerpos (a 20 $\mu$ 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  $\mu$ L) fue incubada con IgG anti-ratones de PE-cabra durante 30 minutos a RT para rotular anticuerpos de murina anti- $\alpha$ V $\beta$ 3, anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 , anti-  $\beta$ 3, o anti- $\alpha$ V para análisis de dos colores. Todos los tubos fueron fijados con paraformaldehído al 1%.

**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.**

Placas Linbro fueron recubiertas durante 1 hora a temperatura ambiente con 50  $\mu$ L/pozo de vitronectina (Collaborative, Becton Dickinson) a 5  $\mu$ 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. 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  $\mu$ g/mL en un tubo cónico de 50 mL (envuelto en lámina). Las células fueron incubadas de 10 a 15 minutos a 37°C. Células rotuladas con calceína fueron levadas una vez con HBSS y se volvieron a poner en suspensión en HBSS suplementado con 0,1% de BSA y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. 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  $\mu$ L a  $7,5 \times 10^6$ / mL) fueron preincubadas con soluciones de anticuerpos (37  $\mu$ L de solución de 10X)  $\pm$  de anti- $\alpha$ V $\beta$ 5 (P1F6) ascites (Chemicon) (37  $\mu$ 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  $\mu$ L por pozo en triplicado (aproximadamente  $6 \times 10^5$  células/pozo). Las placas fueron incubadas durante 45 minutos a 37°C. Las células no ligadas fueron retiradas por dos lavados con HBSS/calcio (150  $\mu$ L/pozo). Se añadieron 100  $\mu$ L de HBSS/calcio a cada pozo y la placa se leyó sobre el Fluoroskan a 485-538 nm.

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  $\mu$ L) fue agregado a vitronectina (10  $\mu$ g/mL) recubierto 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  $\mu$ 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 adhesión de células. La adhesión de células a pozos recubiertos con BSA sirvió como control negativo.

### **Determinación de dependencia de Ca<sup>++</sup> para conexión de Mabs $\nabla$ VE3/ $\nabla$ VE5 anti-humanos a sus ligandos**

Para determinar la dependencia catiónica en la unión de CNTO 95 y C372 a  $\nabla$ VE3 o  $\nabla$ VE5, una fase líquida EIA fue utilizada. Placas EIA (Corning) fueron  
5 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. Las placas fueron bloqueadas con 1% de BSA diluido en HBSS en presencia o en ausencia de 2 mM Ca<sup>++</sup> durante por lo menos una hora a 37EC. Doblando diluciones de  $\nabla$ VE3 (log JG52599) o partiendo de  $\nabla$ VE5 (Chemicon) partiendo a 10 :g/mL fueron  
10 preincubados con 50 mM de EDTA (Sigma) en 1% de BSA/HBSS sin Ca<sup>++</sup> o con 1% de BSA/HBSS con Ca<sup>++</sup> 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 CNTO95, C372, c7E3 para  
15 detectar  $\nabla$ VE3 ligador, se agregó Mab LM609 a 20 :g/mL en 1% de BSA/HBss  $\nabla$  Ca<sup>++</sup>, a la placa recubierta con LM609 para percibir aglomerante  $\nabla$ VE3, de añadió Mab CNTO95 a 20 :g/mL en BSA/HBSS al 1%  $\nabla$  Ca<sup>++</sup>; a las placas recubiertas con CNTO95, C372, c7E3 recubiertas para detectar aglomerante se agregó Mab VNR139 (Gibco) a 10 :g/mL en BSA/HBSS al 1%  $\nabla$  Ca<sup>++</sup> y se incubó durante 30  
20 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.

## Resultados y discusiones

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

Una fusión, llamada GenO, fue llevada a cabo a partir de un ratón genpharm inmunizado con proteína  $\alpha V\beta 3$ . A partir de esta fusión, se 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<sub>K</sub> y ambos fueron

10 sunclonados 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

20 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  $\mu\text{g/mL}$ .

**Composición 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 anti- $\alpha_v\beta_3$ , anti- $\alpha_v\beta_5$ , anti- $\beta_3$ , o anti- $\alpha_v$  compitieron con CNTO 95 para unirse 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- $\beta_3$ , o anti- $\alpha_v$  eran capaces de ligarse a células M21 (no se muestran 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 µg/mL                                      |            | 20 µg/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- $\beta_3$ (Chemicon)       | 5,42                                         | 125%       | 13,10    | 91%        |
| anti- $\beta_3$ (AMAC)           | 4,61                                         | 106%       | 13,10    | 91%        |
| P1F6                             | 4,87                                         | 112%       | 14,46    | 101%       |
| VNR139 (anti- $\alpha_v$ )       | 4,61                                         | 106%       | 14,86    | 104%       |

MCF = Fluorescencia de canal medio

**Inhibición de  $\alpha V\beta 3$  o  $\alpha V\beta 5$  dependientes de célula M21 o Adhesión de MDAMB435L2 a placas recubiertas con vitronectina por  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  Mabs específicos.**

Las células M21 se adhieren a placas recubiertas con vitronectina en una  
5 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 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  
10 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 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  
15 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 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  
20 de antagonista en presencia de P1F6, los datos fueron normalizados hasta la  
ligazón máxima en ausencia de antagonista pero en presencia de P1F6. 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  $\mu\text{g/mL}$  (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  $\alpha\text{V}\beta 3$  y/o el receptor  $\alpha\text{V}\beta 5$  con vitronectina.

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

Se sabe que la presencia del catión calcio es necesaria para que el Mab c7E3 se una a  $\alpha\text{V}\beta 3$  y no es un requisito para la unión de Mab LM609 a  $\alpha\text{V}\beta 3$  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  $\alpha\text{V}\beta 3$  o  $\alpha\text{V}\beta 5$ . 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  $\alpha\text{V}\beta 3$  no es dependiente de la presencia de Ca (Figura 4a, 4b). Lo mismo es cierto para el enlace entre CNTO 95 y  $\alpha\text{V}\beta 3$  pero no así, no obstante, para el enlace entre C372 a  $\alpha\text{V}\beta 5$  (Figura 4e, 4f) a medida que la ligadura parece ser incrementada en presencia de Ca.

#### **Conclusión**

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  $\alpha V\beta 3$  y dependiente de calcio a  $\alpha V\beta 5$  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. Fierlander y colaboradores, Science 270: 1500-1502 (1995).
8. Wayner, y colaboradores, J.Cell Biol. 113: 919-929 (1991).

#### Ejemplo 3: Afinidades de ligazón para anticuerpo integrin dual

##### 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.

**OBJETIVO**

5        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.

10    **ABREVIATURAS**

         Kd, constante de equilibrio de disociación, expresada en M  
         Bmax = número máximo de sitios de unión.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

15    **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 de Dubelcco que contenían 10% de suero bovino fetal (FBS, Cultivo de Células Labs), piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2mM (todos  
20    provenientes de JRH Biosciences).

         Células HT29, una línea celular de carcinoma de colon humano que 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  
25    mM, y L-glutamina 2mM.

Células M21, un melanoma humano que expresa integrins  $\alpha_v\beta_3$ , y  $\alpha_v\beta_5$ , 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.

5

### Integrins

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.

10

### Anticuerpos

GenO.95 fue purificado a partir de cultivo de células sobrenadantes por cromatografía de proteína A. ReoPro fue fabricado en Centocor, Inc. LM609, un anticuerpo de murina anti-humana  $\alpha_v\beta_3$ , (1976ZK, lote 20020559 y lote 1910329) y P1F6, un anticuerpo de murina anti-humano  $\alpha_v\beta_5$ , (1961 P-K, lote 17110560) fueron comprados de Chemicon.

15

### Radiorotulación

Anticuerpos fueron radiorotulados con  $^{125}\text{I}$  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 parte alícuota en el contador gamma o Topcounter (Packard).

20

25

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

## 5 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  $\mu\text{l}$  por pozo sobre placas Linbro de poliestireno de 96 pozos (Flujo/ICN) durante la noche a 4°C. Las 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 con buffer de TBS-Tween (TBS + 0,1% Tween 20), peroxidasa conjugada de IgG F(ab')<sub>2</sub> anti-humana de cabra (H+L, Jackson lote 16869), a dilución de 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 hidrocloreuro de o-fenilenediamina (OPD, Sigma) compuesta de ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sodio 0,2 M, 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1 mg/ml OPD. El desarrollo de color fue detenido después de 15 minutos a temperatura ambiente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 N, y las placas fueron leídas a OD<sub>490</sub> nm en el lector de placas Molecular Dynamics.

Se generaron curvas de unión con PRISM GraphPad (versión 3, Software GraphPad). Los resultados fueron expresado como % máximo de unión del valor de saturación. K<sub>d</sub>, 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.

#### 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 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 células unidas en el Top Counter (Packard).

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.

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:

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

B<sub>máx</sub>, los sitios máximos de unión por célula, y el K<sub>d</sub> fueron determinados a partir de un ajuste de regresión no lineal, de los datos utilizando PRISM.

## 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  $\alpha_v\beta_3$ , y  $\alpha_v\beta_5$ , 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, Kd, y número de receptor, Bmax (Motulsky H, 1999).

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  $K_d$  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  $\alpha_v\beta_5$ .

5

Los valores de afinidad de ligamento para integrins purificados fueron comparados con ligamento a receptores expresados sobre varias líneas celulares. La Figura 7A-C muestra el ligamento de 125-I de GenO.95 con células A375S2 las cuales expresan  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  (Fig.7A). Los valores de afinidad media sobre células  
10 A375S2 fueron:  $K_d = 5,2 \pm 2,04 \times 10^{-9}$  M, y  $120.000 \pm 37.000$  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  $81.000 \pm 24.000$  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:  $K_d = 8,5 \pm 3,03 \times 10^{-9}$   
15 M; y  $200.000 \pm 80.000$  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;  
20 y  $370.000 \pm 190.000$  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  $660.000 \pm 120.000$  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).

25 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                         | $5,2 \pm 2,04 \times 10^{-9}$<br>(n = 5) | 120.000 $\pm$<br>37.000 (n=7)  | $1,3 \pm 0,38 \times 10^{-9}$<br>(n = 5) | 81.000 $\pm$<br>24.000 (n=7) | $8,5 \pm 3,03 \times 10^{-9}$ (n = 4) | 200.000 $\pm$<br>80.000 (n=8)     |
| ReoPro                          | $22 \pm 3,7 \times 10^{-9}$              | 370.000 $\pm$<br>190.000 (n=6) | Despreciable<br>(n=4)                    | Despreciable<br>(n = 4)      | $10 \pm 2,00 \times 10^{-9}$ (n = 3)  | 660.000 $\pm$<br>120.000<br>(n=7) |
| Anti $\alpha_v\beta_3$<br>LM609 | nd                                       | 300.000 (n=2)                  | nd                                       | nd                           | nd                                    | nd                                |
| y $\alpha_v\beta_5$ .           | nd                                       | 70.000 $\pm$ 50.000<br>(n=4)   | nd                                       | 73.000 (n=1)                 | Nd                                    | 44.000 (n=2)                      |

5

Varias observaciones fueron de atención especial en las 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 estamanera la afinidad por la unión GenO.95 al integrin purificado  $\alpha_v\beta_5$  fue aproximadamente de  $\delta$ -veces más elevadas que la conexión a  $\alpha_v\beta_3$  de integrin purificado. No obstante, cuando tanto los receptores de integrin están presentes sobre las mismas células, el valor general de la afinidad de aproxima más estréchamente al valor correspondiente al integrin que está en mayor abundancia. De esta manera, sobre células A375S2 y m21 en donde existe más  $\alpha_v\beta_3$  que  $\alpha_v\beta_5$ ,

la afinidad 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,  $1 \times 10^{-9}$  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 integrins  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ . Estos integrins participan en la adhesión, migración, 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 describe 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 es significativamente regulada ascendentemente sobre células vasculares angiogénicas (1-3). El integrin  $\alpha v\beta 5$  estrechamente relacionado pero distinto también ha sido revelado para mediar el proceso angiogenético. Un anticuerpo generado contra  $\alpha v\beta 3$  bloqueó factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF) inducido por angiogénesis, en tanto que un anticuerpo específico para  $\alpha v\beta 5$  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 células endoteliales. El GenO95 es un anticuerpo monoclonal humano que reconoce integrins  $\alpha v \beta 3$  y  $\alpha v \beta 5$ , y estos integrins regulan migración y proliferación de células endoteliales.

- 5 Por lo tanto, determinamos si el GenO95 podría inhibir germinación de células endoteliales. Este ejemplo describe experimentos que demuestran que el GenO95 inhibe germinación de células endoteliales humanas que se desarrollan en una matriz de fibrina.

## 10 Materiales

- El factor de crecimiento de fibroblasto básico humano (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular humano 165 (VEGF<sub>165</sub>) 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 de Chemicon (Temecula, CA). ReoPro y GenO95 fueron obtenidos de Centocor's Clinical Pharmacology and Antibody Technology Department. Fibrinógeno humano (libre de plasminógeno, >95% de proteína coagulable) y gelatina de piel bovina fueron comprados de Sigma (Saint Louis, MI).

20

## Líneas celulares

- 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, factor de crecimiento endotelial vascular humano, hFGF-b, sulfato de gentamicina, y amfotericina-B. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y el medio fue cambiado cada 2 a 3 días. Solamente los pasajes 3 a 8 fueron usados en todos los experimentos.

5

### **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  
10 preparados de acuerdo con las 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 horas a 37°C. Los MCs fueron luego suspendidos en un gran volumen de  
15 medio y cultivados durante 2 a 4 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. 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 contiene varios  
20 anticuerpos. Para prevenir el exceso de fibrinólisis 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 coágulos fue inducida por adición de trombina (0,5  
25 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 CO<sub>2</sub> durante 1 a 3 días. Después de 1-3 días, geles fueron fijados con 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.

5

## Resultados y Discusión

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  
10 están formados por varias células que forman un lumen. Este proceso se parece a formación microcapilar in vivo, puesto que implica migración de células endoteliales, invasión y proliferación de células. La 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  
15 inhibió de manera rutinaria formación de brotes más efectivamente que el GenO95 (Figura 11).

## Conclusión

La formación de nuevos vasos de sangre a partir de vasos de sangre  
20 existentes es un distintivo de angiogénesis. Este proceso puede ser imitado in vitro mediante el ensayo de formación de brote endotelial. Estos brotes 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  
25 células endoteliales estimulados de medios completos, sugiriendo que este anticuerpo puede inhibir de manera efectiva 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 microcapilaridad.

### Referencias

1. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, y Kraft A. 1997. Angiogenesis as a target for Tumor Treatment. *Oncology* 54:177-184.
2. Eliceiri BP, y Cheresch DA. 1999. The role of  $\alpha V$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of actino and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103:1227-1230.
3. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reissfeld RA, 1994. Integrin  $\alpha V\beta 3$  antagonists promote tumor regresión by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164.
4. Enenstein J, Walweh NS, y Kramer RH. 1992. Basic FGF y TGF- $\beta$  differentially modulate integrin expresión of human microvascular endotelial cells. *Exp. Cell Res.* 203:499-503.
5. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, y Cheresch DA. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha V$  integrins. *Science* 270:1500-1502.
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 integrin sobre adhesión a célula de tumor y endotelial, migración e invasión.**

#### **Resumen**

Ratones híbridos F<sub>2</sub> (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  $\alpha V\beta 3$  placentar humana. Una fusión produjo un anticuerpo monoclonal IgG1k totalmente humano  $\alpha V\beta 3$  reactivo llamado GenO95. El anticuerpo totalmente humano se encontró ser reactivo a los integrines  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$  (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  $\alpha V\beta 3$  y el  $\alpha V\beta 5$  en una variedad de ensayos basados en células *in vitro*.

#### **Abreviaturas**

- BSA – albúmina de suero bovino  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

DMSO – dimetilsulfóxido

FBS – Suero de feto bovino

Ig – inmunoglobulina

Mab – Anticuerpo monoclonal

5 OD – Densidad óptica

RT – Temperatura ambiente

HUVECS – Células endoteliales de vena umbilical humanas

bFGF – Factor de crecimiento de fibroblasto bovino básico

### Introducción

10 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 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

15 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 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

20 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 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

25 adhesión de células de tumor, migración e invasión, procedimientos requeridos para metástasis de células de tumor. Estudios previos indicaron 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 (VEGF<sub>165</sub>) 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  $\mu$ m) fueron comprados a Becton Dickinson (Bedford, MA). Equipo de ensayo de adhesión de células Vybrant<sup>TM</sup> (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, hidrocortisona, factor de crecimiento epidermal

humano, factor de crecimiento endotelial vascular humano, sulfato de gentamicina y amfotericina-B. Las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> 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.

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.

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  $\alpha$ -MEM suplementado con FBS al 10%, 2 mM L-glutamina, y 1mM piruvato de sodio, y 0,1 mM aminoácidos no esenciales.

#### Citometría de flujo

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  $\mu$ g/ml) y anticuerpo de anti-ratón, FITC-rotulado de cabra, ó anticuerpo de anti-integrin rotulado FITC (10  $\mu$ 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).

#### Ensayo de adhesión

5 Placas de microtítulo (Linbro-Titertek, ICN Biomedicals, Inc) fueron recubiertas a 4°C durante la noche con vitronectina (1 µg/ml), gelatina (0,1%), fibrinógeno (100 µg/ml), colágeno tipo I (10 µg/ml), o fibronectina (10 µg/ml). Inmediatamente antes de uso, las placas fueron enjuagadas con PBS y bloqueadas durante 1 hora con BSA/PBS al 1% (pH 7.4). Pozos mitrotitulados recubiertos con  
10 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  
15 ajustada hasta  $5 \times 10^5$  /ml, las células fueron incubadas con varias concentraciones de anticuerpos durante 15 minutos a 37°C. La mezcla de célula-anticuerpo fue agregada a pozos (100 µl 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  
20 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-  
25 Transpozos con una membrana de poliestireno (6,5 mm de diámetro, 10 µm de espesor, y un tamaño de poro de 8 µm). Cultivos de células de 24-hr sub-

confluentes (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 $\mu$ l) fueron agregadas a la cámara superior en presencia o en ausencia de anticuerpos. Para facilitar migración quimiotáctica de células, se añadieron 750  $\mu$ l de medio que contenía 0,1% de BSA y vitronectina (2  $\mu$ 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 (Glen Mills, PA). El programa de computador analiza el área total ocupada 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**

Se llevaron a cabo ensayos de migración de células utilizando las cámaras de transpozo según se describió anteriormente con leves modificaciones. Brevemente, el lado inferior de la membrana fue recubierto con vitronectina (2  $\mu$ 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  $\mu$ l) 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 (100.000/500  $\mu$ l) 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.

5

### Ensayo de Invasión

Fibrinógeno (Libre de plasminogen, 100  $\mu$ l de 10 mg/ml) y 100  $\mu$ l de 1 U/ml de trombina fueron mezclados e inmediatamente agregados a la cámara superior de placas de transpozo de 24 pozos (6,5 mm de diámetro, 10  $\mu$ m de espesor y un tamaño de poro de 8,0  $\mu$ m, Costar). Las placas 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  $\mu$ g/ml de plasminogen (Enzyme research Labs, Suth Bend, IN) con varias concentraciones de anticuerpos, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Células (100.000/500  $\mu$ l) 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 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 según se describió anteriormente.

### 25 Resultados y discusiones

El GenO95 inhibe adhesión de células intervenida por  $\alpha$ V $\beta$ 3 y  $\alpha$ V $\beta$ 5

Puesto que GenO95 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 5 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  $\alpha V\beta 3$  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 10 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 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, 15 GenO95 (10  $\mu\text{g/ml}$ ).

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 20 parcialmente a fibrinógeno, gelatina y placas recubiertas con fibrina, indicando que el anticuerpo puede bloquear a  $\alpha V\beta 3$  y a  $\alpha V\beta 5$  (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 GenO95 25 inhibió completamente la adhesión de células HUVEC y A375S.2 a 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 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).

10

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 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).

20

25

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.

5

| Adhesión (%) +/- SD |              |             |             |            |              |                    |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------------|
|                     | Vitronectina | Gelatina    | Fibrinógeno | Fibrina    | Fibronectina | Colágeno<br>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         |

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 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<br>Tipo I |
| IgG humano          | 104,0 ± 5,3  | 94,6 ± 12,4 | 102,5 ± 5,9 | 99,5 ± 4,0  | 100,0 ± 5,5  | 99,1 ± 3,3         |
| 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).

10

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 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

15

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 suero (Figuras 7-8). Estos hallazgos podrían  
ser potencialmente importantes para terapia tanto angiogénica como de tumor  
5 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.

Migración de HUVECS hacia 2  $\mu\text{g/ml}$  de vitronectina. El ensayo fue llevado  
10 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, (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.  
15 Los datos fueron normalizados a porcentaje control (sin anticuerpos) el cual se  
consideró como 100 %, y cada punto es la media de tres filtros transwell (+/-SD).

Migración de HUVECS hacia 2  $\mu\text{g/ml}$  de vitronectina en presencia de  
anticuerpos hacia  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$ . El ensayo de migración fue llevado a cabo según  
20 se describió en Métodos, y se permitió que las células migraran durante 6 horas.  
LM609 y P1F6 son mAbs dirigidos a  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$ , 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  
25 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  
5 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  
10 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 considerado  
15 como 100%, y cada punto es la media de tres filtros de transpozó (+/- 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  $\mu\text{g/ml}$ . La  
20 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  
25 considerado como 100%, y cada punto es el término medio de tres filtros de  
trnaspozó (+/-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  $\mu$ g/ml), y la Figura 19(E), GenO95 (20  $\mu$ g/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  $\mu$ g/ml de vitronectina, y el ensayo fue llevada 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  $\mu$ g/ml); la Figura 20(C), GenO95 (40  $\mu$ 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.

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  $\alpha V\beta 3$  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  
5 controles 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). Un ensayo de invasión fue permitido proceder durante 24 horas y los datos fueron  
10 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  $\mu$ g/ml), la Figura 21(C) y (D) son una representación gráfica de invasión de células en presencia de GenO95, 10E5 F(ab')<sub>2</sub>, LM609, P1F6, LM-P1F6 (LM609+P1F6), IgGs humano de y ratón  
15 (H-IgG y M-IgG). La Figura gráfica 21(D): la concentración de todos los anticuerpos y proteínas es 10  $\mu$ 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 transpozo (+/- SD).

## 20 Conclusión

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

Referencias

1. Taylor, L.D., C.E. Carmack, D. Huszar, K.M. Higgins, R. Mashayekh, G. Sequar, 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. Trounstein, 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. *Oncology* 54: 177-184.
6. Elicieri , B. P., and D. A. Cheresh . 1999. The role of  $\alpha$  & V integrins during angiogenesis : insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 1227-1230.

7. Fridlander M., P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, and D. A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$ V integrins. Science 270: 1500-1502.

- 5 Resultará claro que la invención puede ser practicada de otro modo 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 dentro

- 10 del alcance de las reivindicaciones anexas.

### REIVINDICACIONES

5           ①     Un anticuerpo recombinante monoclonal humano que enlaza específicamente integrinas alfa-v-beta 3 y alfa-V-beta 5 caracterizado porque comprende las secuencias de amino ácido (CDR) de cadena pesada de SEQ ID No: 1, 2 y 3 y las secuencias de aminoácido CDR de cadena ligera de SEQ ID Nos.: 4, 5 y 6.

10

2.     El anticuerpo recombinante monoclonal humano de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado además por comprender la secuencia de aminoácido CDR de cadena pesada de SEQ ID No. 7.

15

3.     El anticuerpo recombinante monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque comprende la secuencia de aminoácido CDR de cadena ligera de SEQ ID No. 8.

20           ④     Una molécula de ácido nucleico recombinante caracterizada porque codifica el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

          ⑤     Una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4.

25

6. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo recombinante monoclonal de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 y uno o más portadores o diluentes farmacéuticamente aceptables.

Clarke, Modet & C<sup>o</sup>  
COLOMBIA

ESCOBAR - URIBE ASOCIADOS  
Intellectual Property

2529/P

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **03-017.962**  
Solicitud de patente a nombre de **Centocor, Inc.**

Yo, JIMENA ESCOBAR URIBE, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Cra. 11 No. 86-53 Piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **Centocor, Inc.**, domiciliada en Malvern, Pennsylvania, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 08706 del 19 de julio de 2007 relacionado con el concepto técnico de fondo No. 1012, me permito manifestar lo siguiente:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nueva memoria descriptiva y nuevo capítulo reivindicatorio, en los cuales se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1 Se ordenó la secuencia lógica de las páginas que presentaban problemas de espacios en blanco, con lo cual ahora se puede realizar una lectura secuencial y coherente de la materia divulgada en la presente invención.

1.2. Se reemplazó el antiguo capítulo reivindicatorio por uno comprendido de seis reivindicaciones dirigidas al anticuerpo recombinante monoclonal humano que enlaza específicamente integrinas alfa-v-beta 3 y alfa-V-beta 5 caracterizado porque contiene las secuencias de amino ácido (CDR) de cadena pesada de SEQ ID No: 1, 2 y 3 y las secuencias de aminoácido CDR de cadena ligera de SEQ ID Nos.: 4, 5 y 6. Además, a la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo y a la molécula de ácido nucleico que las codifica.

Sobre este particular, me permito decir que las anteriores modificaciones tienen su debido sustento dentro de la memoria descriptiva y el antiguo capítulo reivindicatorio y por ende, las mismas no amplían la materia objeto de la presente invención.

Para este efecto, me permito acompañar el recibo número 07-89,775 del 1 de noviembre de 2007 con el cual queda cubierta la tasa correspondiente a la modificación en cuanto al capítulo reivindicatorio.

## **2. Claridad de la solicitud**

### **2.1 Descripción de la invención.**

Sobre este particular, me permito manifestar que la presente invención en su descripción sí posee claridad, toda vez que para una persona versada en la materia serán lo suficientemente específicas las características técnicas de los anticuerpos desarrollados a partir de los datos encontrados en la descripción y del listado de secuencias que acompañan a la misma.

En este orden de ideas se dirige la atención de ese despacho a las nuevas páginas 108 en adelante donde a través de un estudio minucioso se puede constatar que se revela de manera completa y clara los procedimientos para realizar los experimentos realizados para sustentar la patente.

### **2.2 Capítulo reivindicatorio**

En cuanto a las objeciones de claridad expuestas por el examinador en su concepto técnico, me permito decir que gracias a las modificaciones realizada en las reivindicaciones quedan completamente superadas, toda vez que las mismas reclaman ahora un anticuerpo con secuencias determinadas y no hay ambigüedad respecto a lo que se desea reivindicar, es decir, anticuerpos monoclonales recombinantes para la unión con integrinas del tipo alfa V beta 3 y 5.

## **3. Unidad de Invención**

Respecto a esta objeción establecida por el examinador con base en el capítulo reivindicatorio anterior, resulta prudente señalar que el nuevo juego de reivindicaciones cumple con el requerimiento de unidad, toda vez que existe un elemento técnico común el cual es el anticuerpo recombinante monoclonal humano con las características reveladas en la nueva reivindicación 1.

## **4. Material biológico**

Al respecto del material biológico revelado en la presente invención, resulta necesario decir que el mismo no es un material aislado de la naturaleza, sino que es el resultado de la creatividad del solicitante a fin de lograr anticuerpos monoclonales recombinantes. En este sentido, me permito señalar que además con la aclaración en el capítulo reivindicatorio en el sentido que el anticuerpo es recombinante, una persona medianamente versada en la técnica comprenderá que

los anticuerpos revelados en esta solicitud, son el producto de técnicas de combinación conocidas en el campo de la bioquímica para obtener moléculas recombinantes.

## 5. Excepciones a la patentabilidad

En cuanto a las antiguas reivindicaciones 5, 10, 15, 20 y 25 que reclamaban métodos de diagnóstico, me permito decir que las mismas ya no hacen parte del pliego reivindicatorio ahora presentado y por lo tanto, queda cabalmente superada esta objeción.

En conclusión, me permito decir que a la luz de la modificación realizada en el capítulo reivindicatorio y los ajustes realizados en la memoria descriptiva, la presente invención cumple con los requerimientos de claridad, unidad de invención. En consecuencia, solicito comedidamente a ese despacho conceder el privilegio de patente a la solicitud en estudio.

Señor Superintendente,

JIMENA ESCOBAR URIBE  
CC39.779.452 de Usaquén  
T.P. 68228  
Cód. 5376

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



504

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(51) International Patent Classification <sup>7</sup> :</b><br><b>C12N 15/00, 15/11, A61K 39/395, C07K 16/00, 16/18, 16/28</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>A1</b> | <b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 00/31248</b><br><b>(43) International Publication Date:</b> 2 June 2000 (02.06.00)                                                                   |
| <b>(21) International Application Number:</b> PCT/US99/27971<br><b>(22) International Filing Date:</b> 24 November 1999 (24.11.99)<br><br><b>(30) Priority Data:</b><br>09/199,149 24 November 1998 (24.11.98) US<br><br><b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION [US/US]; One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103 (US).<br><br><b>(72) Inventors; and</b><br><b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> JOHANSON, Kyung, O. [US/US]; 28 Haymarket Lane, Bryn Mawr, PA 19010 (US). JONAK, Zdenka, L. [US/US]; 128 Ladderback Lane, Devon, PA 19333 (US). TAYLOR, Alexander, H. [US/US]; 522 Westfield Drive, Exton, PA 19341 (US). TRULLI, Stephen, H. [US/US]; 2015 Belvedere Avenue, Havertown, PA 19083 (US).<br><br><b>(74) Agents:</b> BAUMEISTER, Kirk et al.; SmithKline Beecham Corporation, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US). |           | <b>(81) Designated States:</b> CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Published</b><br><i>With international search report.</i> |
| <b>(54) Title:</b> HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |           |                                                                                                                                                                                                          |
| <b>(57) Abstract</b><br><p>This invention relates to novel humanized and other recombinant or engineered antibodies or monoclonal antibodies to a human <math>\alpha_v</math> subunit-containing heterodimeric integrin receptors and to the genes encoding same. Such antibodies are useful for the therapeutic and/or prophylactic treatment of disorders mediated by such receptors, such as cancer, in human patients.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |                                                                                                                                                                                                          |

505

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. An altered antibody that neutralizes the human  $\alpha_v\beta_3$  protein receptor and the human  $\alpha_v\beta_5$  protein receptor comprising a heavy chain comprising at least one CDR sequence of Fig. 1C, and functional fragments of the antibody.
2. The antibody according to claim 1 having a light chain comprising at least one light chain CDR sequence of Fig. 2C.
3. The antibody according to claim 1, wherein the heavy chain comprises the three CDRs of Fig. 1C.
4. The antibody according to claim 3, wherein the light chain comprises the three CDRs of Fig. 2C.
5. The antibody according to claim 1 which comprises the light chain amino acid sequence of Fig. 2C and the heavy chain amino acid sequence of Fig. 1C.
6. The antibody according to claim 1 which comprises the light chain amino acid sequence of Fig. 5 and the heavy chain amino acid sequence of Fig. 1C.
7. The antibody according to claim 1 which comprises the heavy chain amino acid sequence of Fig. 1C and a light chain of a human antibody.
8. The antibody according to claim 1 wherein said fragment is selected from the group consisting of Fv, Fab and F(ab')<sub>2</sub>.
9. An isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of:
  - (a) a nucleic acid sequence encoding any of the antibodies and fragments of any of claims 1-8;
  - (b) a nucleic acid complementary to any of the sequences in (a); and
  - (c) a nucleic acid sequence of 18 or more nucleotides capable of hybridizing to (a) or (b) under stringent conditions.
10. A recombinant plasmid comprising the nucleic acid sequence of claim 9.
11. A host cell comprising the plasmid of claim 10.
12. A process for the production of a human antibody specific for a human  $\alpha_v$  subunit-containing heterodimeric receptor comprising culturing the host cell of claim 11 in a medium under suitable conditions of time temperature and pH and recovering the antibody so produced.
13. A method of detecting a disorder characterized by overexpression of a human  $\alpha_v$  subunit-containing heterodimeric receptor comprising contacting a source suspected of containing said overexpressed receptor with a diagnostically effective amount of the antibody of claim 1 and measuring the binding of the antibody to the source.
14. A pharmaceutical composition comprising at least one dose of an