



No. 13-154218-00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:23:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

13 154218

54. TÍTULO "PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF- α "

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12P 21/06

71. SOLICITANTE ABBVIE, INC

DOMICILIO NORTH CHICAGO, ESTADO DE ILLINOIS,
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 28 JUN 2013

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-154218- -00000-0000 Fecha: 2013-06-28 16:23:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII Act. 411 PRESENTACION Folios: 4
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL-PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/063955	Fecha 08/12/11
Publicación Internacional No.		WO 2012/078878 A2	Fecha 14/06/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-α"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
C12P 21/06			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
4. APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. ABBVIE, INC			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, Estados Unidos de América.	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		North Chicago	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Illinois	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	Estado de Delaware, Estados Unidos de América
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. HSIEH		Chung-ming	Estados Unidos de América
2. GOODREAU		Carrie	Estados Unidos de América
3. GHAYUR		Tariq	Estados Unidos de América
4. MOELLER		Achim	Alemania
5. BOSE		Sahana	Estados Unidos de América
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Massachusetts	Newton	1. 22 Olde Field Road, Newton, Massachusetts 02459, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Ludlow	2. 201 Stevens Street, Ludlow, Massachusetts 01056, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Holliston	3. 1014 Washington Street, Holliston, Massachusetts 01746, Estados Unidos de América.
Alemania		Gruenstadt	4. Im Zauruecken 10, 67269 Gruenstadt, Alemania.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Marlborough	5. 48 Frobes Avenue, Marlborough, Massachusetts 01752, Estados Unidos de América.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P.53.215
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Bogotá	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS		Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América.		US	61/420,999	10/12/08
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0061818	Fecha 25-06-2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio).</i>				
				
ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante				
C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 115		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 54		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

VER ANEXO CD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

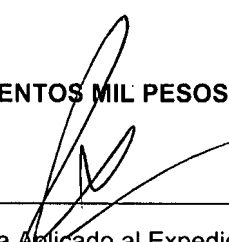
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0061818
		Bogotá D.C., Junio 25 de 2013 - 07:49:17

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292846	24/06/2013	18.408.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	
			Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
			500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154218- -00000-0000
Fecha: 2013-06-28 16:23:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF- α
RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Proteínas de unión al TNF- α que incluyen anticuerpos quiméricos, con CDR injertadas y humanizados que se unen al TNF- α . Las proteínas de unión presentan una afinidad elevada por el TNF- α y neutralizan la actividad del TNF- α . Una proteína de unión puede ser un anticuerpo completo o una porción de un anticuerpo que puede unirse al TNF- α . Métodos para elaborar y usar las proteínas de unión. Las proteínas de unión al TNF- α son útiles para detectar el TNF- α y para inhibir la actividad del TNF- α , lo que puede realizarse, por ejemplo, en un sujeto humano que padece una enfermedad o un trastorno donde la actividad del TNF- α es perjudicial.

SECTOR: Biotecnología. Proteínas de Unión a TNF- α útiles en el Tratamiento de enfermedades inmunológicas agudas y crónicas.

PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF- α

La presente invención reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos N° 61/420999, presentada el 8 de diciembre de 2010.

Campo de la Invención

Se proveen proteínas de unión al TNF- α y su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inmunológicas agudas y crónicas, tales como la artritis reumática, la osteoartritis, la psoriasis, la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes.

Antecedentes

En la técnica existe la necesidad de anticuerpos mejorados que puedan unirse al TNF- α .

Resumen

Se provee una nueva familia que abarca proteínas de unión, anticuerpos con CDR injertadas, anticuerpos humanizados y fragmentos de éstos que pueden unirse al TNF- α , y más precisamente, pueden unirse al TNF- α con una afinidad elevada y pueden neutralizar el TNF- α . También se proveen anticuerpos y porciones de unión al antígeno de éstos que pueden unirse al TNF- α y que comprenden secuencias de aminoácidos como las que se detallan en cualquiera de SEQ ID N° 31-46.

Descripción Detallada

Se proveen proteínas de unión al TNF- α , por ejemplo, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF- α . Diversos aspectos se relacionan con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y composiciones farmacéuticas que los contienen, así como con ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para elaborar dichos anticuerpos y fragmentos de éstos. También se contemplan métodos para usar las proteínas de unión en la detección del TNF- α humano o en la inhibición del TNF- α humano, lo cual puede tener lugar in vitro o in vivo, y en la regulación de la expresión de los genes.

A menos que se los defina de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen los significados que comúnmente les dan los especialistas en el arte. El significado y el alcance de los términos deberían ser claros; sin embargo, en el caso en que haya una ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que lo requiera de otro modo el contexto, los términos singulares incluirán las formas plurales y los términos plurales incluirán las formas singulares. El término “o” abarca “y/o”, a menos que se indique lo contrario. El uso del verbo “incluir” y sus conjugaciones no ha de interpretarse de manera limitativa. También, los términos tales como “elemento” o “componente” abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los métodos y los procedimientos generalmente se ponen en práctica de maneras convencionales, bien conocidas en las técnicas del cultivo de células y tejidos, de la biología molecular, de la inmunología, de la microbiología, de la genética, de la química y la hibridación de las proteínas y los ácidos nucleicos, de la química analítica, de la química orgánica sintética, de la medicina, de la farmacia, de la preparación, la formulación y la administración de fármacos y del tratamiento de los pacientes. Estos procedimientos también se describen en las referencias que se citan en la presente. Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se los conoce en la técnica o como se describe de otra manera en la presente.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente para hacer referencia a una cadena polimérica de aminoácidos. El término “polipéptido” abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término “proteína aislada” o “polipéptido aislado” hace referencia a

una proteína o un polipéptido que no está asociado a los componentes con los que se asocia y que lo acompañan en su estado nativo, por ejemplo, se halla sustancialmente libre de otras proteínas o componentes celulares de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que es sintetizado por medios químicos o es sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina naturalmente estará “aislado” de los componentes con los que se halla asociado en la naturaleza. Una proteína también puede liberarse sustancialmente de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza si se la aísla usando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término “recuperar” hace referencia al proceso de liberar sustancialmente una especie química, tal como un polipéptido, de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza, aislándola, por ejemplo, por medio de procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término “TNF- α humano” (que en la presente se abrevia hTNF- α) abarca una proteína que es una citoquina dimérica. El término abarca una proteína homotrimérica que comprende tres proteínas del TNF- α de 17,5 kD. La proteína homotrimérica se conoce como la “proteína del TNF- α ”. El término “TNF- α humano” abarca el TNF- α humano recombinante (TNF- α), que puede prepararse de acuerdo con métodos de expresión recombinante convencionales. La secuencia del TNF- α humano se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia del TNF- α humano

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
TNF- α humano	SEQ ID N° 1	VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQ LQWLNDRANALLANGVELRDNQLVV PSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVL

		LTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQ LEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQV YFGIIAL
--	--	--

El término “actividad biológica” hace referencia a todas las propiedades biológicas inherentes de una molécula. Las propiedades biológicas del TNF- α incluyen, sin limitaciones, la unión al receptor del TNF.

Los términos “unión específica” o “se une específicamente”, como se lo usa en la presente, con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítopo) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítopo “A”, la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o A libre, sin marcar) en una reacción que contenga “A” marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término “proteína de unión” abarca, sin limitaciones, cualquier anticuerpo o cualquier porción de unión al antígeno de un anticuerpo. Las proteínas de unión también incluyen otras construcciones que presentan afinidad de unión por un blanco. En algunas instancias, estas proteínas de unión pueden presentar similitudes estructurales con los anticuerpos o con las porciones de unión al antígeno de éstos, y también pueden presentar diferencias estructurales que las distinguen de los anticuerpos o de las porciones de unión al antígeno de éstos.

El término “anticuerpo”, se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivado de éstas, que retienen las características esenciales de unión al epítopo de una molécula Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la

técnica. En la presente documentación se describirán realizaciones no limitativas de dichos formatos.

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada HCVR o VH en la presente) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (abreviada LCVR o VL en la presente) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), que están separadas por regiones conservadas, conocidas como regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas, desde el extremo aminoterminal hacia el extremo carboxiterminal, en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hTNF- α). La función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas formas de realización de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, con especificidad dual o multiespecíficos, es decir, pueden unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento

dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., Publicación PCT N° WO 90/05144), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple (scFv) también se consideran dentro del término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, con lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel, editores, *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 páginas (ISBN 3-540-41354-5).

El término “anticuerpo construido”, hace referencia a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno, unidas a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Estos conectores peptídicos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Holliger, et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace referencia a un dominio constante de una cadena pesada (gama) o liviana (kapa y delta). Las secuencias de aminoácidos

de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena liviana de la IgG humana son conocidas en la técnica y se representan en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias del dominio constante de la cadena pesada y del dominio constante de la cadena liviana de la IgG humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID N° 2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
Región constante mutante de Ig gamma-1	SEQ ID N° 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

		ENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK
Región constante de Ig kappa	SEQ ID N° 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVIACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Región constante de Ig Lambda	SEQ ID N° 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RYSYCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Adicionalmente, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de unión al antígeno con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de estas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, et al. (1995) *Human Antibod. Hybridom.* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aun, los anticuerpos, las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente documentación.

El término “anticuerpo aislado” hace referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF- α está sustancialmente libre de los anticuerpos que se unen a antígenos distintos de hTNF- α). Sin embargo, un anticuerpo aislado que

se une específicamente a hTNF- α puede presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tal como moléculas del TNF- α de otras especies. Más aun, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

El término “anticuerpo humano” incluye aquellos anticuerpos que comprenden regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que hayan sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio in vitro, o por mutaciones somáticas in vivo), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano” no incluye anticuerpos donde se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias de regiones de marco humanas.

El término “anticuerpo humano recombinante” incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (que se describirá más adelante en la Sección IIC), anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy y Highsmith (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo y Larrick (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom y Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas (véanse, por ejemplo, Taylor et al., *Nucl.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann y Green (2002) *Current Opin. Biotechnol.* 13:593-597; Little et al. (2000) *Immunol. Today* 21:364-370) o los anticuerpos preparados, expresados o aislados por cualquier otro medio que comprenda separar secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas para obtener otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tendrán regiones variables y constantes derivadas de secuencias de

inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas formas de realización, estos anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a una mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal, pueden no existir en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo* bajo condiciones naturales.

El término “anticuerpo quimérico” hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie, y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana unidas a regiones constantes humanas.

El término “anticuerpo con una CDR injertada” hace referencia a un anticuerpo que comprende secuencias de la región variable de la cadena pesada y de la cadena liviana provenientes de una especie, pero en el que se han reemplazado una o más de las CDR de las regiones VH y/o VL por secuencias de CDR de otra especie, como es el caso de los anticuerpos que comprenden regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana en las que se han reemplazado una o más CDR humanas (por ejemplo, la CDR3) por secuencias de CDR murinas.

El término “CDR” hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de la secuencia variable de un anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término “conjunto de CDR” hace referencia al grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable (es decir, VH o VL) de un sitio de unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al. (1987, 1991), *Sequences de Proteins de Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md.) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los residuos que

puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia et al. (Chotia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 y Chotia et al., Nature 342:877-883 (1989)) descubrieron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones casi idénticas en sus esqueletos peptídicos, a pesar de que hay una gran diversidad a nivel de las secuencias de aminoácidos. Estas sub-porciones se denominaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde “L” y “H” hacen referencia a las regiones de la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR Chotia, y tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR superpuestas con las CDR de Kabat fueron descritos por Padlan et al. (1995) FASEB J. 9:133-139 y MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-745. Otras definiciones de los límites de las CDR pueden no ser estrictamente acordes con los sistemas anteriores, pero aun así pueden superponerse con las CDR de Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de que hay residuos o grupos de residuos particulares, o incluso CDR completas, que no afectan significativamente la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente documentación pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en algunas realizaciones se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Los términos “numeración de Kabat”, “definición de Kabat” y “nomenclatura de Kabat” se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos hacen referencia a un sistema para numerar los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo o en una porción de unión al antígeno de éste (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391; y Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende

entre las posiciones de los aminoácidos 31 y 35 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 y 65 para CDR2 y entre las posiciones de los aminoácidos 95 y 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena liviana, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 24 y 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 y 56 para CDR2 y entre las posiciones de los aminoácidos 89 y 97 para CDR3.

El crecimiento y el análisis de grandes bases de datos públicas de secuencias de aminoácidos de las regiones variables pesada y liviana durante los últimos veinte años han permitido comprender los límites típicos entre las regiones del marco de trabajo (FR) y las secuencias de las CDR dentro de las secuencias de la región variable, lo que les permitió a aquellos versados en la técnica determinar con precisión las CDR de acuerdo con la numeración de Kabat, la numeración de Chotia u otros sistemas. Véase, por ejemplo, Martin, en Kontermann y Dübel, editores, *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, Berlín, 2001), capítulo 31, paginas 432-433. A continuación se provee un método útil para determinar las secuencias de aminoácidos de las CDR de Kabat dentro de las secuencias de aminoácidos de las regiones variable pesada (VH) y variable liviana (VL):

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L1:

Comienza aproximadamente a 24 residuos de aminoácido desde el extremo amino terminal de la región VL;

El residuo anterior a la secuencia de CDR-L1 siempre es cisteína (C);

El residuo posterior a la secuencia de CDR-L1 siempre es un residuo triptofano (W), típicamente Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), pero también Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) y Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

La longitud típicamente es de 10 a 17 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L2:

Siempre comienza 16 residuos después del final de CDR-L1;

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-L2 generalmente son Ile-Tyr (I-Y), pero también Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) y Ile-Phe (I-F);

La longitud siempre es de 7 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L3:

Siempre comienza 33 aminoácidos después del final de CDR-L2;

El residuo anterior a la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 siempre es una cisteína (C);

Los residuos posteriores a la secuencia de CDR-L3 siempre son Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID N° 6), donde X es cualquier aminoácido;

La longitud típicamente es de 7 a 11 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H1:

Comienza aproximadamente 31 residuos de aminoácido desde el extremo amino terminal de la región VH y siempre 9 residuos después de una cisteína (C);

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-H1 siempre son Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID N° 7), donde X es cualquier aminoácido;

El residuo posterior a la secuencia de CDR-H1 siempre es un Trp (W), típicamente Trp-Val (W-V), pero también Trp-Ile (W-I) y Trp-Ala (W-A);

La longitud típicamente es de 5 a 7 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H2:

Siempre comienza 15 residuos de aminoácidos después del final de CDR-H1;

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-H2 típicamente son Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID N° 8), pero también son posibles variaciones de éstos;

Los residuos posteriores son Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

La longitud típicamente es de 16 a 19 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H3:

Siempre comienza 33 residuos de aminoácido después del final de CDR-H2 y siempre 3 después de una cisteína (C)'

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-H3 siempre son Cys-X-X (C-X-X), donde X es cualquier aminoácido, típicamente Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Los residuos posteriores a la secuencia de CDR-H3 siempre son Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID N° 9), donde X es cualquier aminoácido;

La longitud típicamente es de 3 a 25 residuos de aminoácidos.

Los términos “acceptor” y “anticuerpo acceptor” hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. En algunas formas de realización, el término “acceptor” hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica las regiones constantes. En aun otra realización, el término “acceptor” hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones de marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término “acceptor” hace referencia a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un anticuerpo que proporciona o codifica al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un acceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco de trabajo aceptora y/o una región constante aceptora, por ejemplo, puede derivar o puede obtenerse a partir de un anticuerpo de la línea germinal, un gen de un anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

El término residuo “canónico” hace referencia a un residuo en una CDR o un marco que define una estructura canónica de CDR particular, como lo definen Chotia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-907; y Chotia et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799. De acuerdo con Chotia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto

de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un rizo.

Los términos “donante” y “anticuerpo donante” hacen referencia a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización particular, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término “anticuerpo donante” hace referencia a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

El término “marco” o “secuencia de marco” hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena liviana y CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena liviana y en la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, donde CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 está localizada entre FR2 y FR3 y CDR3 está localizada entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definido otros, representa las FR combinadas en la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina de ocurrencia natural. Una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

Las secuencias aceptoras de cadena pesada y liviana humanas son conocidas en la técnica. En una forma de realización, la secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena liviana humanas de la invención se seleccionan entre las secuencias enumeradas por V-base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) o por IMGT®, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics®. (<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/>). . En otra forma de realización las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena liviana humanas de la invención se seleccionan entre las secuencias descritas en la tabla 3 y en la tabla 4.

Tabla 3. Secuencias aceptoras de la cadena pesada

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		123456789 0 123456789 0 123456789 012
10	VH1-18 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
11	VH1-18 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
12	VH1-18 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
13	VH7-4.1 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT
14	VH7-4.1FR2	WVRQAPGQGLEWMG
15	VH7-4.1 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR
16	JH1/JH4/JH5 FR4	WGQGTlVTVSS
17	JH2 FR4	WGRGTlVTVSS
18	JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
19	jh3 fr4	WGQGTMTVTVSS

Tabla 4. Secuencias aceptoras de la cadena liviana

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		123456789 0 123456789 0 123456789 012
20	1-39/o12 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	1-39/o12 FR2	WYQQKPGKAPKILIIY
22	1-39/o12 FR3	GVPSRFSGSGSGTdTFTLTISLQPEDFATYYC

23	6d-41/A14 FR1	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC
24	6d-41/A14 FR2	WYQQKPDQAPKLLIK
25	6d-41/A14 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC
26	JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
27	jk5 fr4	FGQGTRLEIKR
28	jk1 fr4	FGQGTKVEIKR
29	jk4 fr4	FGGGTKVEIKR
30	JK3 FR4	FGPGTKVDIKR

El término “gen de anticuerpo de la línea germinal” o “fragmento de gen” hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce a un reordenamiento genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas formas de realización deriva del descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores probabilidades que los genes de genes maduros de conservar estructuras esenciales en su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que es menos probable sean reconocidos como extraños cuando se los use con fines terapéuticos en dicha especie.

El término residuos “fundamentales” hace referencia a determinados residuos dentro de la región variable que tienen un impacto mayor sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, sin que esto constituya limitación alguna, uno o más de los siguientes: un residuo que se halla adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana, un residuo en la zona de Vernier, y un residuo en una región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por

Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat.

El término “anticuerpo humanizado” hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o cabras), pero donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más “similares a humanos”, es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con una CDR injertada donde las secuencias CDR no humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL humanas para reemplazar las secuencias de marcos de trabajo (FR) no humanas correspondientes. Por ejemplo, un “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo, o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento de éste, que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. El término “sustancialmente”, en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado sustancialmente comprende la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una

cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena liviana humanizada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En formas de realización específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o una cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitaciones, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y los dominios constantes particulares pueden seleccionarse con el fin de optimizar las funciones efectoras deseadas usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

No es necesario que las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias progenitoras; por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso puede haber sido mutada mediante la sustitución, la inserción y/o la supresión de al menos aproximadamente un residuo de aminoácido, de modo que el residuo de la CDR o el marco en dicho sitio no corresponde al anticuerpo donante o al marco consenso. En una realización particular, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, y al menos aproximadamente 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de las FR y CDR progenitoras. El término “marco consenso” hace referencia a la región del marco de trabajo en la secuencia de la inmunoglobulina consenso. El término “secuencia de inmunoglobulina consenso” hace referencia a la secuencia formada con los aminoácidos de ocurrencia más frecuente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). Por consiguiente una “secuencia de inmunoglobulina consenso” puede comprender un “dominio

variable consenso” y/o un “dominio constante consenso”. A su vez, un “dominio variable consenso” puede comprender una o más “regiones de marco de trabajo consenso” y/o una o más “CDR consenso”. En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Cuando dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

El término “zona Vernier” hace referencia a un subconjunto de residuos del marco que pueden ajustar la estructura de la CDR y ajustarla con precisión para que se una al antígeno como, lo describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que queda debajo de las CDR, y pueden afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

En esta memoria descriptiva se usa el término “proteína de unión multivalente” para hacer referencia a una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. En una forma de realización, la proteína de unión multivalente se diseña para que tenga tres o más sitios de unión al antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término “proteína de unión multiespecífica” hace referencia a una proteína de unión con la capacidad de unir dos o más blancos relacionados o no relacionados. Las proteínas de unión de dominio variable doble (DVD) son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno, y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Dichas proteínas de unión a DVD pueden ser monoespecíficas, es decir, capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficas, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena liviana se conocen como una molécula de DVD-Ig™. Cada mitad de una DVD-Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena liviana, y dos sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana, con la participación de un total de 6 CDR en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno. Las

proteínas de unión DVD, y los métodos para preparar las proteínas de unión DVD, se describen en la Patente de los EEUU N° 7612181.

Un aspecto se relaciona con una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión con capacidad de unirse al TNF- α . En otra forma de realización, la proteína de unión DVD puede unirse al TNF- α y a un segundo blanco.

El término “neutralizador” hace referencia a la neutralización de la actividad biológica de una citoquina cuando una proteína de unión se une específicamente a la citoquina. En una forma de realización, una proteína de unión neutralizador es un anticuerpo neutralizador cuya unión a la hTNF- α da como resultado la inhibición de una actividad biológica de la hTNF- α . En una forma de realización, la proteína de unión neutralizadora se une al hTNF- α y reduce una actividad biológica del hTNF- α al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85% o más. La inhibición de una actividad biológica del hTNF- α por una proteína de unión neutralizadora puede determinarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica del hTNF- α bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la neutralización de la citotoxicidad del TNF- α en células L929.

El término “actividad” abarca actividades como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, como es el caso de un anticuerpo anti-hTNF- α que se une a un antígeno del TNF- α , y/o la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, de un anticuerpo anti-hTNF- α cuya unión al hTNF- α inhibe la actividad biológica del hTNF- α , como es el caso de la neutralización de la citotoxicidad del TNF- α en células L929.

El término “epitope” incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un receptor de célula T o inmunoglobulina. En determinadas formas de realización, los epitopes determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y en determinadas formas de realización, pueden tener características específicas

en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno donde se une un anticuerpo. Un epítopo consiste entonces de los residuos de aminoácido de una región de un antígeno (o un fragmento de éste) conocido por unirse al sitio complementario sobre el miembro de unión específico. Un fragmento antigénico puede contener más de un epítopo. En determinadas formas de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de forma preferencial su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Un epítopo consiste entonces de los residuos de aminoácido de una región de un antígeno (o un fragmento de éste) conocido por unirse al sitio complementario sobre el miembro de unión específico. Un fragmento antigénico puede contener más de un epítopo.

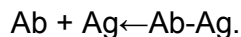
El término “resonancia de plasmón superficial”, hace referencia a un fenómeno óptico que permite analizar las interacciones bioespecíficas a tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIACORE (Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para hallar descripciones adicionales, véanse Jönsson, et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término “ K_{on} ” hace referencia a la constante de activación para la asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) con el antígeno, para formar, por ejemplo, el complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica. La “ K_{on} ” también se conoce como “constante de velocidad de asociación”, o “ k_a ”, términos que se usan indistintamente en la presente documentación. Este valor, que indica la velocidad de unión de un anticuerpo con su antígeno blanco, o la velocidad de formación de un complejo entre un anticuerpo y el antígeno, también puede obtenerse de acuerdo con la ecuación:



El término “ K_{off} ” hace referencia a la constante de desactivación para la

disociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), por ejemplo, del complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en el arte. La “ K_{off} ” también se conoce con los términos “constante de velocidad de disociación”, o “ k_d ”, que se usan indistintamente en la presente. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno blanco o la separación del complejo Ab-Ag en el tiempo en el anticuerpo y antígeno libres según se muestra en la siguiente ecuación:



Los términos “constante de disociación en el equilibrio” o “ K_D ”, usados indistintamente en la presente, hacen referencia al valor obtenido en una medición de titulación en el equilibrio, o a la división de la constante de la velocidad de disociación (K_{off}) por la constante de la velocidad de asociación (K_{on}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de activación y desactivación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en amortiguadores fisiológicos en equilibrio. Pueden usarse otros abordajes e instrumentos experimentales, tales como el ensayo BIAcore (análisis de interacción biomolecular), por ejemplo, los instrumentos disponibles en BIAcore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, también puede usarse un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), disponible en Savidyne Instruments (Boise, Idaho).

El término “proteína de unión marcada” hace referencia a una proteína con una marca incorporada que permite identificar la proteína de unión. En una forma de realización, la marca es una marca detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión de porciones biotiniladas a un polipéptido, donde dichas porciones pueden ser detectadas por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede ser detectada por medios métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcas para polipéptidos

incluyen, sin limitaciones, los que se indicarán a continuación: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{11}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm); marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánido-fósforos), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos de biotín; epitopes de polipéptidos predeterminados que son reconocidos por un informante secundario (por ejemplo, secuencias de cierre [*zipper*] de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas de epitope); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.»

El término “anticuerpo conjugado” hace referencia a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida a una segunda porción química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término “agente” indica un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido a partir de materiales biológicos. En una forma de realización, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, sin limitaciones, toxinas pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de éstos.

Los términos “cristal” y “cristalizado” hacen referencia a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una

disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la “célula individual” del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véase Giege y Ducruix (1999) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª edición, pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York)

El término “polinucleótido” hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de cadena simple y doble de ADN o ARN.

El término “polinucleótido aislado” hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, de ADNc o sintético, o una combinación de éstos) que no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el cual está asociado en la naturaleza, con el cual está ligado operativamente en la naturaleza, o con el cual aparece en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término “vector” hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que designa un rizo de ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse en forma autónoma en la célula huésped en la que han sido introducidos (por ejemplo, los vectores bacterianos con un origen de replicación en bacterias y los vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella, por lo que se replican junto con el genoma del huésped. Más aun, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con los que están unidos operativamente. Estos vectores se conocen en la presente como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión útiles para los procedimientos de ADN recombinante comúnmente toman la forma de

plásmidos. En esta solicitud, “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, las formas de realización pretenden incluir estas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

El término “ligado operativamente” hace referencia a la ubicación de los componentes de manera tal que funcionan de la manera pretendida. Una secuencia control “unida operativamente” a una secuencia codificante está ligada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias “ligadas operativamente” incluyen secuencias de control de la expresión que son contiguas de un ácido nucleico de interés, secuencias de control de la expresión que actúan *in trans*, es decir, están ubicadas sobre una molécula de ácido nucleico diferente que un ácido nucleico de interés pero que no obstante ejercen control sobre el ácido nucleico de interés y secuencias de control de la expresión que están ubicadas sobre la misma molécula de ácido nucleico, pero a una cierta distancia, de un ácido nucleico de interés. El término “secuencia de control de la expresión” hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para obtener la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se lo desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas secuencias de control incluyen

promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión.

La “transformación”, como se la define en la presente, hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula huésped. La transformación puede tener lugar bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en el arte para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo. El método se selecciona sobre la base de la célula huésped a transformar, y puede incluir, sin limitaciones, la infección viral, la electroporación, la lipofección y el bombardeo de partículas. Estas células “transformadas” incluyen células transformadas de forma estable, donde el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”) hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. Ha de comprenderse que estos términos no solamente hacen referencia a la célula sujeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Como es posible que ocurran modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho, esta progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del término “célula huésped”. En una forma de realización, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. En una forma de realización, las células eucariotas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. En una forma de realización, las células huésped incluyen, sin limitaciones, células procariotas de la línea de *E. coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden emplearse técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante y oligonucleótidos, y para cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación y lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, de maneras conocidas en la técnica o como se describe en la presente. Las técnicas y los procedimientos mencionados generalmente pueden ponerse en práctica de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en toda la memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning*: (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

El término “organismo transgénico” hace referencia a un organismo que tiene células que contienen un transgen, donde el transgen introducido en el organismo (o cualquier ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un “transgen” es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, donde dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos “regular” y “modular” se utilizan indistintamente y se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hTNF- α). La modulación puede ser un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula de interés. Los ejemplos de actividades y funciones de una molécula incluyen, sin limitaciones, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares y transducción de señales.

Correspondientemente, el término “modulador” hace referencia a un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o una función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hTNF- α). Por ejemplo, un modulador puede provocar un incremento o una disminución en la

magnitud de una actividad o una función determinada de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En determinadas formas de realización, un modulador es un inhibidor que reduce la magnitud de al menos una actividad o una función de una molécula. Los ejemplos de inhibidores incluyen, sin limitaciones, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos, hidratos de carbono o pequeñas moléculas orgánicas. Los peptidocuerpos se describen, por ejemplo, en WO01/83525.

El término “agonista” hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un incremento en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, sin limitaciones, polipéptidos del TNF- α , o proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono o cualquier otra molécula que se una a hTNF- α .

Los términos “antagonista” o “inhibidor” hacen referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas particulares de interés incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hTNF- α . Los antagonistas y los inhibidores de hTNF- α pueden incluir, sin limitaciones, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualquier otra molécula capaz de unirse a hTNF- α .

El término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o la duración de un trastorno o uno o más de sus síntomas, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico).

El término “muestra biológica” incluye, sin limitaciones, una cantidad de una sustancia de un organismo vivo o un organismo que estuvo vivo. Estos organismos vivos incluyen, sin limitaciones, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Estas sustancias incluyen, sin limitaciones, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

I. Anticuerpos que se unen al TNF- α humano

En un aspecto, se proveen anticuerpos monoclonales murinos aislados, o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF con gran afinidad, que presentan una disociación lenta y una gran capacidad de neutralización. En un segundo aspecto, se proveen anticuerpos quiméricos que se unen al TNF- α . En un tercer aspecto, se proveen anticuerpos con injertos de CDR, o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF- α . En un cuarto aspecto, se proveen anticuerpos humanizados o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF- α . En una realización, los anticuerpos o sus porciones son anticuerpos aislados. En una forma de realización, los anticuerpos son anticuerpos neutralizadores anti-TNF- α humano.

A. Métodos para obtener anticuerpos anti-TNF- α

Los anticuerpos pueden prepararse con cualquier procedimiento conocido en la técnica.

1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α usando tecnología de hibridomas

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de éstas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las que son conocidas en la técnica y que se detallan, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, et al., en “Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas”, en

Research Monographs in Immunology, vol. 3 (J.L. Turk, editor general; Elsevier, N.Y., 1981). El término “anticuerpo monoclonal” no se limita a los anticuerpos producidos con tecnología de hibridomas. El término “anticuerpo monoclonal” hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método con el que se lo produce.

Los métodos para producir y buscar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son de uso común y bien conocidos en la técnica. En una realización, se proveen métodos para generar anticuerpos monoclonales, y también anticuerpos producidos con el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo, donde el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno con células de mieloma, y luego analizando los hibridomas que resultan de la fusión para hallar los clones de hibridomas que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido. En resumen, los ratones pueden inmunizarse con un antígeno de el TNF- α . En una realización, el antígeno TNF- α se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmune. Estos coadyuvantes incluyen el coadyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos de inmunocoloración). Estos coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped para que secrete factores quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. En una realización, si se administra un polipéptido, el cronograma de inmunización comprenderá dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas en un período de varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con el antígeno del TNF- α , se pueden obtener anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos del animal. El suero que contiene al anticuerpo anti-TNF- α se obtiene del animal por desangrado o sacrificio del animal. El suero puede usarse tal como se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina del suero o se

pueden purificar anticuerpos anti-TNF- α a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, por lo que tienen una serie heterogénea de propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, una vez que se detectan los anticuerpos específicos para el antígeno del TNF- α en el suero del ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Después, los esplenocitos se fusionan de acuerdo con procedimientos bien conocidos a cualquier célula de mieloma apropiada, por ejemplo, células de la línea celular SP20, disponible en. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada. Los clones de hibridomas se evalúan de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para determinar la presencia de células capaces de secretar anticuerpos con la capacidad de unirse al TNF- α . El fluido de ascites, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, puede generarse inmunizando ratones con clones de hibridomas positivos.

En otra forma de realización, los hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos pueden prepararse a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B de bazo se fusionan a células de mieloma inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. En una forma de realización, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea de células no secretoras). Después de la fusión y selección con antibióticos, los hibridomas se seleccionan usando TNF- α , o una porción de éste, o una célula que exprese TNF- α . En una realización, el análisis inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). En la Publicación PCT N° WO 00/37504, se provee un ejemplo de análisis ELISA.

Se seleccionan los hibridomas productores de anticuerpos anti-TNF- α , se clonan y se examinan por otras características deseables, incluyendo crecimiento de hibridomas robustos, gran producción de anticuerpos y características deseables del anticuerpo, como se describirá más adelante. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en

un cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por aquellas personas con experiencia en el arte.

En una forma de realización, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió con anterioridad. En otra forma de realización, los hibridomas se producen en un animal no humano, en una especie distinta del ratón, tal como la rata, la oveja, el cerdo, el ganado bovino o el caballo. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, donde un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-TNF- α .

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epitopes específicos pueden generarse de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden producirse mediante el corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena liviana y el dominio CHI de la cadena pesada.

2. Generación de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α usando SLAM

En otro aspecto, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento conocido en la técnica como el método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de los EEUU N° 5627052, la Publicación PCT WO 92/02551, y Babcock et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, se analizan células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de un animal inmunizado, usando un ensayo en placa hemolítica específico para el antígeno, donde el antígeno TNF- α , una subunidad del TNF- α o un fragmento de éste, se une a eritrocitos de oveja usando un conector, tal como biotina, y se lo usa para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad por TNF- α . Una vez identificadas las células secretoras de anticuerpos de interés, se rescatan los ADNc de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de las

células por PCR con transcriptasa inversa, y estas regiones variables pueden expresarse posteriormente en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células huésped de mamífero, tales como células COS o CHO. Después, las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a otros procedimientos de análisis y selección *in vitro*, por ejemplo, analizando las células transfectadas para aislar aquellas células que expresan anticuerpos contra TNF- α . Las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas pueden someterse a manipulaciones adicionales *in vitro*, por ejemplo, con métodos de maduración por afinidad *in vitro* como los que se describen en la Publicación PCT WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

3. Generación de anticuerpos monoclonales anti-IL- α usando animales transgénicos

En otra forma de realización, los anticuerpos se producen inmunizando un animal no humano que comprende algunos o todos los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno del TNF- α . En una forma de realización, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE®, una cepa de ratón modificada que comprende fragmentos grandes de loci de inmunoglobulina humana y presenta una producción de anticuerpos diferentes. Véanse, por ejemplo, Green et al. (1994) Nature Genet. 7:13-21 y las Patentes de los EEUU N° 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 y 6130364. Véanse también las Publicaciones PCT N° WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; y WO 00/37504. El ratón transgénico XENOMOUSE® produce un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos del antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE® contiene aproximadamente 80% del repertorio humano merced a la introducción de fragmentos YAC con la configuración de la línea germinal humana, con un tamaño en el orden de las megabases, que

contienen loci de la cadena pesada humana y loci de la cadena liviana humana. Véase Mendez et al. (1997) *Nature Genet.* 15:146-156; y Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188: 483-495.

4. Generación de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α usando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

También pueden usarse Métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos, donde se analiza una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para dicho examen de las bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos que se describen, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N° 5223409; publicación PCT N° WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; WO 97/29131; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1369-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nucl. Ácidos Res.* 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, y la publicación de Patente de los EEUU N° 2003/0186374.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con TNF- α o una porción del TNF- α . Como alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto naïve, es decir, uno que no ha sido inmunizado con TNF- α , como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con TNF- α humano. Los anticuerpos se seleccionan examinando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende el TNF- α humano para así seleccionar a los anticuerpos que reconocen TNF- α . Los métodos para realizar este procedimiento de análisis y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias en el párrafo precedente. Para seleccionar

los anticuerpos que tienen afinidades de unión particulares por hTNF- α , tales como aquellos que se disocian del TNF- α humana con una constante de disociación particular, puede usarse el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar los anticuerpos que tienen la constante de disociación deseada. Para seleccionar los anticuerpos que tienen una actividad de neutralización de hTNF- α particular, tales como aquellos que presentan una IC₅₀ particular, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para determinar la inhibición de la actividad de hTNF- α .

En un aspecto se hace referencia a un anticuerpo aislado, o una porción de unión al antígeno de éste, que se une a BSG2, por ejemplo, TNF- α humano. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador. En diversas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos parentales de la presente también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, estos fagos pueden emplearse para presentar dominios de unión al antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una esfera. Los fagos usados en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, e incluyen los dominios de unión fd y M13, expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados por enlaces disulfuro fusionados en forma recombinante al gen III o al gen VIII de proteínas del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para obtener los anticuerpos incluyen los que se describen en Brinkmann et al. (1995) J.

Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al. (1997) Gene 187 9-18; Burton et al. (1994) Adv. Immunol. 57:191-280; Solicitud PCT N° PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT N° WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de los EEUU N° 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 y 5969108.

Una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo obtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá con mayor detalle en la presente. Por ejemplo, también podrán emplearse procedimientos para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ de manera recombinante que sean bien conocidos en la técnica, tales como los que se describen en la Publicación PCT N° WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6):864-869; Sawai et al. (1995) Am. J. Reprod. Immunol. 34:26-34; y Better et al. (1988) Science 240:1041-1043. Los ejemplos de procedimientos que pueden usarse para producir fragmentos Fv y anticuerpos de cadena simple incluyen los que se describen en las Patentes de los EEUU N° 4946778 y 5258498; Huston et al. (1991) *Methods Enzymol.* 203:46-88; Shu et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; y Skerra et al. (1988) Science 240:1038-1041.

Como alternativa al análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación en fagos, pueden aplicarse otras metodologías conocidas en la técnica para analizar grandes bibliotecas de combinación con el fin de identificar anticuerpos con especificidad dual. Un tipo de sistema de expresión alternativa es uno donde la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteínas, como se describe en la Publicación PCT N° WO 98/31700, por Roberts y Szostak (1997) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que codifica mediante la traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que contienen puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por consiguiente, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca de combinación) sobre la base de las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, el anticuerpo o la porción de éste, tales como la unión del anticuerpo o la porción de éste al antígeno con especificidad dual. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de éstos, recuperadas del análisis de dichas bibliotecas, pueden expresarse por medios recombinantes como se describió con anterioridad (por ejemplo, en células huésped de mamífero), y más aun, pueden someterse a una maduración de afinidad adicional con procedimientos adicionales de análisis de fusiones de ARNm-péptidos en cuyas secuencias originales se han introducido mutaciones, o con otros métodos de maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió con anterioridad.

En otro abordaje, los anticuerpos también pueden generarse usando métodos de presentación en levaduras conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levaduras, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura, de modo que sean presentados en la superficie de la levadura. En particular, estas levaduras pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de expresión en levadura que pueden usarse para elaborar los anticuerpos incluyen los divulgados en la Patente de los EEUU N° 6699658.

B. Producción de anticuerpos recombinantes contra el TNF- α

Los anticuerpos pueden producirse con cualquiera de una cantidad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión puede efectuarse a partir de células huésped en las cuales se han transfectado uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y liviana de acuerdo con procedimientos convencionales. Las diversas formas del término

“transfección” abarcan una amplia variedad de procedimientos de uso común para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque es posible expresar los anticuerpos en células huésped procariotas o eucariotas, en una forma de realización, se emplean células huésped de mamíferos, ya que es más probable que en las células eucariotas (y particularmente en las células de mamíferos) se pliegue y se secrete correctamente un anticuerpo con actividad inmunológica.

Las células huésped de mamíferos para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr⁻ descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en Kaufman y Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que contienen genes que codifican el anticuerpo se introducen en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped hasta que el anticuerpo se expresa en dichas células huésped, o el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Después, los anticuerpos pueden aislarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Del mismo modo, es posible usar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Ha de comprenderse que las variaciones del procedimiento anterior se hallan dentro del alcance de las formas de realización. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena liviana y/o la cadena pesada de un anticuerpo. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para retirar una parte o la totalidad del ADN que codifica las cadena liviana y/o la cadena pesada que no es necesario para la unión con los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también quedan incluidas dentro de los anticuerpos. Además, es posible producir anticuerpos

bifuncionales, donde una cadena pesada y una cadena liviana son un anticuerpo y la otra cadena pesada y la otra cadena liviana tienen especificidad por un antígeno diferente del antígeno de interés, por medio del cruzamiento de un anticuerpo con un segundo anticuerpo, de acuerdo con métodos de cruzamiento químico convencionales.

En un sistema que sirve como ejemplo para la expresión recombinante de un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena liviana del anticuerpo en células CHO dhfr⁻ a través de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de obtener niveles de transcripción elevados de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que permite seleccionar las células CHO dhfr⁻ transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener el anticuerpo del medio de cultivo. También se provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante, que comprende cultivar una célula huésped en un medio de cultivo apropiado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante. Además, el método puede comprender aislar dicho anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

1. Anticuerpos anti-hTNF- α

En la tabla 5 se provee una lista de las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de determinados anticuerpos anti-hTNF- α murinos.

Tabla 5. Lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de determinados anticuerpos anti-hTNF- α murinos

SEQ ID N°	Región proteica		Secuencia
			123456789012345678901234567890
31	VH mak199		QIQLVQSGPELKKPGETVMISCKAS GYTFT NYGMN WVKQAPGKGLKWMGW INTYTGEPTYADDFKGR FAFSLETS ASTAYLQINNLIKNEDTATYFCAR KF LTTVVVTDYAMDY WGQGTSVTVSS
	VH MAK199 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 31	NYGMN
	VH MAK199 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 31	WINTYTGEPTYADDFKG
	VH MAK199 CDR-H3	Residuos 99-113 de SEQ ID N° 31	KFLT TTVVVTDYAMDY
32	v1 MAK199		DIQMTQTTSSLSASLGDRVITIS CRA SQDISNYLN WYQQKPDGTVKLLIYY TSRLQS GVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFC QQGNTLPPT FGV GTKLELK
	VL MAK199 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID N° 32	RASQDISNYLN
	VL MAK199	Residuos	YTSRLQS

	CDR-L2	50-56 de SEQ ID N° 32	
	VL MAK199 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID N° 32	QOGNTLPPT

2. Anticuerpos anti-hTNF- α quiméricos

Un anticuerpo quimérico es una molécula donde las distintas porciones del anticuerpo derivan de animales de distintas especies, tales como los anticuerpos que tienen una región variable que deriva de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se describen en detalle en los Ejemplos. Véase, por ejemplo, Morrison (1985) Science 229:1202; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; y las Patentes de los EEUU N° 5807715, 4816567 y 4816397. Además, pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” por corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad antigénica apropiado junto con los genes de una molécula de anticuerpo humano de una actividad biológica apropiada (Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454).

En una forma de realización, los anticuerpos quiméricos se producen reemplazando la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales anti-TNF- α humanos de murinos que se describen en sección 1 con una región constante de la IgG1 humana.

3. Anticuerpos anti-TNF- α con CDR injertadas

Los anticuerpos con CDR injertadas comprenden secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo humano, donde una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L han sido reemplazadas por

secuencias de CDR de los anticuerpos murinos. Una secuencia de la región del marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo directo de cadenas en una de estas regiones de marco comúnmente resulta en una cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, menor es la probabilidad de que la combinación de las CDR murinas con la región del marco humana introduzca distorsiones en las CDR que puedan reducir la afinidad. Por ello, en una forma de realización, el marco de trabajo variable humano que se elige para reemplazar el marco de trabajo variable de murinos, además de las CDR, tiene al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, aproximadamente 100%, de identidad de secuencia con el marco de trabajo de la región variable del anticuerpo de murinos. Los métodos para producir anticuerpos con injertos de CDR son conocidos en el arte y se describen con detalle junto con la humanización de dichos anticuerpos con injertos de CDR en los Ejemplos (véase también, la Patente EP N° EP 0 239 400; la publicación PCT N° WO 91/09967; las Patentes de los EEUU N° 5225539, 5530101 y 5585089); reformulación de residuos en superficie o reformulación de superficie (Patentes EP N° EP 0 592 106 y EP 0 519 596; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) *Protein Eng.* 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973) y entremezclado de cadenas (Patente de los EEUU N° 5565352).

En una realización específica, se proveen anticuerpos con CDR injertadas con cadenas V_H y/o V_L como los que se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos con CDR injertadas

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		123456789012345678901234567890
33	hMAK199VH.1z	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARKFLT TVVVTDYAMDYWGQGTITVTVSS
34	hMAK199VH.2z	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARKFLT TVVVTDYAMDYWGQGTITVTVSS
35	hMAK199VL.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGQGT KLEIK
36	hMAK199VL.2	DVVMVTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQDISNYLN WYQQKPDQAPKLLIKYTSRLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFITISLEAEDAATYYCQQGNTLPPTFGQGT KLEIK

4. Anticuerpos anti-hTNF- α humanizados

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que contienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y regiones de marco de trabajo de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/inmunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Inmune/Antibody.html;

www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Inmunology.html. www.inmunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehimeu.acjp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isacnet.org/sites_geo.html;
aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/inmuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html; Kabat et al., Sequences de Proteins de Immunological Interest, Departamento de Salud de los EEUU (1983). Estas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la afinidad de unión, la velocidad de activación, la velocidad de desactivación, la avidéz, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica apropiada, como es conocido en la técnica.

Los residuos de la región del marco de trabajo en las regiones del marco humano pueden reemplazarse por los residuos correspondientes de la CDR del anticuerpo donante para alterar, mejorar la unión al antígeno. Estas

sustituciones del marco de trabajo se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelación de las interacciones de los residuos de la CDR y del marco de trabajo para identificar los residuos del marco de trabajo que son importantes para la unión al antígeno y por comparación de secuencias para identificar residuos poco comunes del marco de trabajo en posiciones particulares (Véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 5585089; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327. Los modelos tridimensionales de las inmunoglobulinas están disponibles comercialmente y han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. Hay programas informáticos disponibles con los que pueden representarse las estructuras tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite analizar la participación de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de unión de la inmunoglobulina candidata a su antígeno. De este modo, pueden aislarse y combinarse residuos FR de secuencias consenso e importadas con el fin de obtener una característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad de unión por uno o más antígenos blanco. En general, los residuos de las CDR tienen una influencia directa y más sustancial sobre la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en el arte, tales como sin limitaciones las que se describen en Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2296-2308; Chotia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289; Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2623-2632; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) *Protein Eng.* 7(6):805-814; Roguska. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973; publicaciones PCT N°; WO 91/09967, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234), WO 92/01047 (PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), WO 90/14443, WO 90/14424, y WO 90/14430; publicación

Europea N° EP 0592106, EP 0519596 y EP 0239400; Patentes de los EEUU N° 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539 y 4816567.

C. Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de Anticuerpos

En una forma de realización, los anticuerpos anti-TNF- α presentan una capacidad elevada de reducir o neutralizar la actividad del TNF- α , lo cual puede determinarse, por ejemplo, con cualquiera de los diversos ensayos in vitro e in vivo que se conocen en la técnica. En otra forma de realización, los anticuerpos anti-TNF- α también presentan una capacidad elevada de reducir o neutralizar la actividad del TNF- α .

En formas de realización particulares, el anticuerpo aislado, o una porción de unión al antígeno de éste, se une al TNF- α humana, donde el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se disocia de el TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o inhibe la actividad de el TNF- α humana con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se puede disociar de el TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de el TNF- α con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se puede disociar de el TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de la IL-1 β humana con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se puede disociar de el TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de la IL-1 β humana con una

IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se puede disociar de el TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de la IL-1 β humana con una IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, se puede disociar de el TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} s$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de la IL-1 β con una IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-11} M o menos.

En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. En una realización, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de cadena pesada de IgG4. Más aun, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena liviana, una región constante de la cadena liviana kappa o una región constante de la cadena liviana lambda. En otra realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana kappa. Como alternativa, la porción de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena simple.

Los reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (Patentes de los EEUU N° 5648260 y 5624821). La porción Fc de un anticuerpo interviene en diferentes funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citoquinas, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, citotoxicidad mediada por complemento (CDC) y velocidad de depuración/vida media de los anticuerpos y en los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos, puede ser innecesario o incluso perjudicial, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Determinados isotipos de la IgG humana, en particular IgG1 y IgG3, son mediadores de la ADCC y la CDC a través de la unión a Fc γ Rs y al complemento C1q, respectivamente. Los

receptores Fc neonatales (FcRn) son componentes críticos en la determinación de la vida media en circulación de los anticuerpos. En aun otra forma de realización, al menos un residuo de aminoácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que estas funciones efectoras del anticuerpo resultan alteradas.

En una realización, se provee una proteína de unión marcada donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno de éste, ha sido derivatizado o unido a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada puede obtenerse por derivatización mediante la unión funcional de un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del anticuerpo (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una u otra más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo, un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o un péptido que puede ser mediador de la asociación del anticuerpo o porción de unión al antígeno del anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una marca de polihistidina).

Entre los agentes detectables útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o porción de unión al antígeno, se incluyen los compuestos fluorescentes. Entre los ejemplos de agentes fluorescentes detectables se incluyen la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el cloruro de 5-dimetilamina-1-napfalensulfonilo, la ficoeritrina, y semejantes. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, y semejantes. Cuando el anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se lo detecta agregando reactivos adicionales que son usados por la enzima para generar un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando se encuentra presente la peroxidasa de rábano picante como agente detectable, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina genera un producto de reacción con color, el cual es detectable. Un anticuerpo también puede derivatizarse con biotina y detectarse a través de una medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

En otra forma de realización, se provee una proteína de unión cristalizada. Otra forma de realización se relaciona con cristales de anticuerpos completos anti-TNF- α , y fragmentos de éstos, según se describe en la presente, y con formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una forma de realización, las proteínas de unión cristalizadas tienen una vida media *in vivo* más larga que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra forma de realización, la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

Las proteínas de unión cristalizadas pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descritos en la publicación PCT N° WO 02072636.

En forma de realización, se provee una proteína de unión glicosilada, donde un anticuerpo o la porción de unión al antígeno de éste comprenden uno o más residuos de hidrato de carbono. La producción nativa de proteínas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraducciona. En particular, pueden agregarse residuos de azúcares (glicosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína. Distintos organismos pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (por ejemplo, azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glicosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Entre los residuos glicosídicos útiles se incluyen, sin limitaciones, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido sálico. En una forma de realización, la proteína de unión glicosilada comprende los residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

Aquellos versados en la técnica saben que el cambio en las

glicosilaciones de proteínas puede dar como resultado diferentes características en la proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida por un microorganismo huésped, tal como una levadura, y glicosilada usando la vía endógena de la levadura, puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y presentar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosídicos específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Entre otros efectos adversos pueden incluirse cambios en el plegamiento de las proteínas, su solubilidad, su susceptibilidad a proteasas, su circulación, su transporte, su compartimentalización, su secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, su antigenicidad, o su alergenidad. En consecuencia, un profesional puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición de glicosilación y un patrón idénticos, o al menos similares, a los producidos en las células humanas o las células con especificidad de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede llevarse a cabo mediante la modificación genética de la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando procedimientos conocidos en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión al antígenos de éstos que presenten la glicosilación de las proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural, tales como las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levaduras que presentan una glicosilación proteica idéntica a aquella de las células animales, especialmente las células humanas (Patentes de los EEUU. 7,449,308 y 7,029,872).

Además, aquél versado en la técnica ha de apreciar que es posible expresar una proteína de interés usando una biblioteca de células huésped

diseñadas genéticamente para expresar distintas enzimas de glicosilación, de modo que los miembros de dicha biblioteca de células huésped produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Por lo tanto, un profesional puede seleccionar y aislar una proteína de interés con nuevos patrones de glicosilación particulares. En una forma de realización, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación particularmente seleccionado presenta propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

D. Usos de los anticuerpos anti-TNF- α

Dada su capacidad de unirse al TNF- α humano, las proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF- α humano o porciones de unión al antígeno de éstos, pueden usarse para detectar TNF- α (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como sangre completa, suero, plasma, orina, saliva, muestras de tejido) usando cualquiera de los numerosos sistemas de inmunodetección basados en anticuerpos disponibles en el arte. Dichos sistemas de inmunodetección incluyen, pero en un sentido no limitativo, inmunoprecipitación, inmunotransferencia (transferencia Western), ensayo de inmunabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica de tejidos, resonancia de plasmón superficial (SPR), inmunoensayo de tipo sándwich, métodos de afinidad basados en anticuerpos (por ejemplo, esferas de afinidad, columnas de afinidad), ensayo de inmunocompetencia, ensayo con inmunochip (proteína de unión unida a un chip de silicona) y separación de células activada por fluorescencia (FACS). Para algunos sistemas de inmunodetección, la proteína de unión al TNF- α (o una porción de unión de ésta) está unida a un sustrato sólido usando métodos disponibles en el arte para unir moléculas de anticuerpo al mismo sustrato sólido de modo que la proteína de unión unida retiene su capacidad para unirse al TNF- α humano durante su uso en el sistema de inmunodetección particular. Dichos sustratos sólidos incluyen, pero en un sentido no limitativo, un papel de filtro basado en celulosa (por ejemplo, de celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa), un filtro de nylon, una superficie de plástico (por ejemplo, de una placa para microtitulación o varilla sumergible [*dip stick*]), un sustrato de vidrio

(por ejemplo, filtros, esferas, portaobjetos, lana de vidrio), una partícula polimérica (por ejemplo, agarosa, poliacrilamida) y un chip de silicona. Por ejemplo, puede usarse un sistema de inmunodetección en un método para detectar la presencia del TNF- α en una muestra in vitro (por ejemplo, una muestra biológica, tal como sangre completa, suero, plasma, tejido, orina, saliva, biopsias de tejido). Puede usarse un método tal para diagnosticar una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado con una célula inmune. El método incluye (i) poner una muestra de prueba o una muestra de control en contacto con una proteína de unión al TNF- α o una porción de unión al TNF- α de ésta) descrita en la presente; y (ii) detectar la formación de un complejo entre la proteína de unión anti-TNF- α (o una porción de unión de ésta) y el TNF- α en la muestra de prueba o la muestra de control, donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra de prueba con relación a la muestra de control (o con relación a la formación del complejo en otra muestra de prueba tomado en un momento anterior) es indicativo de la presencia del TNF- α en la muestra.

A modo de otro ejemplo, se puede emplear un método para detectar la presencia de el TNF- α humano in vivo (por ejemplo, en el diagnóstico por imágenes in vivo en un sujeto). El método puede usarse para diagnosticar una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado con TNF- α . El método incluye (i) administrar una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al TNF- α de ésta, descrita en la presente, a un sujeto de prueba o a un sujeto control bajo condiciones que permitan la unión de la proteína de unión, o una porción de unión al TNF- α de ésta, al TNF- α ; y (ii) detectar la formación de un complejo entre la proteína de unión, o una porción de unión de ésta, y el TNF- α , donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto de prueba con relación al sujeto control, o con relación a la formación del complejo en el sujeto de prueba en un momento anterior, es indicativo de la presencia del TNF- α .

Los métodos para detectar TNF- α en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) de acuerdo con la invención comprenden poner una muestra

en contacto con una proteína de unión al TNF- α (o una porción de unión al TNF- α de ésta), descrita en la presente, y detectar ya sea la proteína de unión (o una porción de unión de ésta) unida al TNF- α o la proteína de unión no unida (o una porción de unión de ésta no unida) para así detectar TNF- α en la muestra. La proteína de unión (o una porción de ésta) se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección de la proteína de unión unida o no unida (o una porción de ésta). Dichas sustancias detectables son conocidas en el arte y, a modo de ejemplo no limitativo, incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un ejemplo de un material luminescente incluye luminol. Los ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen los radioisótopos ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm .

Como una alternativa de marcar la proteína de unión, el TNF- α humano puede ser evaluada en una muestra (por ejemplo, un fluido biológico) mediante un inmunoensayo de competencia utilizando estándares del TNF- α humano recombinante (rh) marcados con una sustancia detectable y una proteína de unión al TNF- α no marcada. En este ensayo, se combinan la muestra, los estándares de rh TNF- α marcados y la proteína de unión al TNF- α y se determina la cantidad de estándar de rh TNF- α marcada unida a la proteína de unión no marcada. La cantidad del TNF- α humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhTNF- α marcado unido a la proteína de unión anti-TNF- α . De manera similar, el TNF- α humano también se puede evaluar en una muestra por medio de un inmunoensayo de competencia utilizando estándares de rh TNF- α marcados con una sustancia

detectable y una proteína de unión al TNF- α no marcada.

En una forma de realización, los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de éstos pueden neutralizar la actividad del TNF- α humano tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, estas proteínas de unión pueden usarse para inhibir la actividad del TNF- α , por ejemplo, en un cultivo de células que contienen hTNF- α , en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que comprenden un TNF- α con el que puede reaccionar transversalmente un anticuerpo. En una forma de realización, se provee un método para inhibir la actividad del hTNF- α , que comprende poner en contacto el hTNF- α con un anticuerpo o con una porción de unión al antígeno de éste, de manera tal de inhibir la actividad del hTNF- α . Por ejemplo, a un cultivo de células que contiene hTNF- α o del que se sospecha que contiene hTNF- α puede agregársele un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de éste para inhibir la actividad del hTNF- α .

En otra realización, se provee un método para reducir la actividad de hTNF- α en un sujeto, ventajosamente un sujeto afectado por una enfermedad o un trastorno donde la actividad resultante de hTNF- α es perjudicial. Se proveen métodos para reducir la actividad del TNF- α en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno como los mencionados, donde dichos métodos comprenden administrarle al sujeto un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de éste, de manera tal de reducir la actividad del TNF- α . En otra forma de realización particular, el TNF- α es el TNF- α humana y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto podrá ser un mamífero donde se exprese un TNF- α con la cual pueda unirse el anticuerpo. Aun más, el sujeto puede ser un mamífero en el cual se ha introducido TNF- α (por ejemplo, por administración del TNF- α o por expresión de un transgen del TNF- α). La proteína de unión puede serle administrada a un sujeto humano con fines terapéuticos. Más aún, una proteína de unión al TNF- α puede ser administrada a un mamífero no humano que expresa un TNF- α con la cual el anticuerpo tiene capacidad de unirse con fines veterinarios o como un modelo en animales

de enfermedad humana. Con relación a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos (por ejemplo, evaluando las dosificaciones y la progresión de la administración en el tiempo).

El término “un trastorno donde la actividad del TNF- α es perjudicial” incluye enfermedades y otros trastornos donde se ha demostrado que la presencia del TNF- α en un sujeto que sufre el trastorno es responsable de la patofisiología del trastorno o es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Por ende, un trastorno donde la actividad del TNF- α es perjudicial es un trastorno donde se espera que la reducción de la actividad del TNF- α alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Dichos trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, con un incremento en la concentración del TNF- α en un fluido biológico de un sujeto que sufre del trastorno (por ejemplo, un incremento en la concentración del TNF- α en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), que puede ser detectada, por ejemplo, usando una proteína de unión anti-TNF- α según se describe en la presente. Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos, se incluyen aquellos trastornos indicados en la sección anterior, relacionada con composiciones farmacéuticas de las proteínas de unión.

D. Composiciones farmacéuticas

Se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos pueden emplearse, por ejemplo y sin limitaciones, en el diagnóstico, la detección, el monitoreo, la prevención, la inhibición, la gestión o la mejora de un trastorno o de uno o más de sus síntomas, y/o en la investigación. En una forma de realización específica, la composición comprende una o más proteínas de unión. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más proteínas de unión, y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos para tratar un trastorno donde la actividad del TNF- α es perjudicial.

En aún otra forma de realización, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser de utilidad o que se han usado o que actualmente se usan en la prevención, el tratamiento, manejo o alivio de un trastorno o uno o más síntomas de éste. De acuerdo con estas formas de realización, la composición puede comprender además un vehículo, diluyente o excipiente.

Las proteínas de unión se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de éste) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término “vehículo aceptable para uso farmacéutico” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que demoran la absorción, y semejantes, que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos aceptables para el uso farmacéutico incluyen uno o más entre agua, salina, salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones de éstos. Sería preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Además, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender pequeñas cantidades de sustancias auxiliares, tales como agentes de humectación o emulsionantes, conservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o la eficacia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno de éste.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar una o más proteínas de unión o la combinación de uno o más anticuerpos y un agente profiláctico o agente terapéutico de utilidad para prevenir, manejar, tratar o aliviar un trastorno o uno o más de sus síntomas, por ejemplo, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por un receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico incluyen, pero en un

sentido no limitativo, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración por la mucosa (Patentes de los EEUU N° 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078 y Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903). En una forma de realización, una proteína de unión, una terapia combinada o una composición se administran usando la tecnología para administrar drogas en el pulmón Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts). Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc), y se pueden administrar en combinación con otros agentes con actividad biológica. La administración puede ser sistémica o local.

En una forma de realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos localmente en el área que necesita del tratamiento, por ejemplo, por infusión local, por inyección o por medio de un implante. Un implante puede ser de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®) o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos localmente en el área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o uno de sus síntomas. En otra forma de realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos en forma local en el área afectada, en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de una proteína de unión a un sujeto, para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o uno o más de sus síntomas.

En otra forma de realización, el agente profiláctico o terapéutico puede liberarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una forma de realización, puede usarse una bomba para llevar a cabo una liberación controlada o sostenida (véanse Langer (1990) Science 249:1527-

1533; Sefton (1987) CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507-516; Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra forma de realización, pueden emplearse materiales poliméricos para poner en práctica una liberación controlada o sostenida de las terapias (véanse, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, (Langer y Wise, editores; CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, (Smolen y Ball, editores; Wiley, Nueva York, 1984); Langer y Peppas (1983) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys. C23:61-126; véanse también Levy et al. (1985) Science 228:190-192; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105-112; las Patentes de los EEUU N° 5679377, 5916597, 5912015, 5989463 y 5128326; y las Publicaciones PCT N° WO 99/15154 y WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero en un sentido no limitativo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(metilmetacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinilacetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA) y polioctoésteres. En una forma de realización, el polímero usado en la formulación de liberación sostenida es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable al almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra forma de realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida en la proximidad de un blanco profiláctico o terapéutico, de modo que se requiera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, J.M., Capítulo 6, En *Medical Applications de Controlled Release*, Vol. II, *Applications y Evaluation*, (Langer y Wise, editores)(CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), páginas 115-138).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533. Puede usarse cualquier técnica conocida en el arte para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenda uno o más agentes terapéuticos. Véanse, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 4526938; las Publicaciones PCT N° WO 91/05548 y WO

96/20698; Ning et al. (1996) *Radiother. Oncol.* 39:179-189; Song et al. (1996) *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 50:372-377; Cleek et al. (1997) *Proceed Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; y Lam et al. (1997) *Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760.

En una forma de realización específica, cuando la composición es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión del agente profiláctico o terapéutico que codifica si se lo construye como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y se lo administra de modo de que se torne intracelular, por ejemplo, con el uso de un vector retroviral (véase la Patente de los EEUU N° 4980286), por inyección directa, usando un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont) o un recubrimiento con lípidos o receptores superficiales celulares o agentes de transfección, o administrándolo en combinación con un péptido semejante a homeobox del que se sabe que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1864-1868). Como alternativa, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente y se puede incorporar en el ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación de homólogos.

La composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su ruta de administración pretendida. Entre los ejemplos de rutas de administración, se incluyen, no taxativamente, la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal, y rectal. En una forma de realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a sujetos humanos. Típicamente, las composiciones para una administración intravenosa son soluciones en solución amortiguadora acuosa isotónica estéril. Cuando fuera necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local, tal como lignocamina, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones son para administrar en forma tópica, las formulaciones se pueden formular en la forma de un ungüento, una crema, un parche transdérmico, una loción, un gel, un champú, un atomizado, un aerosol, una solución, una emulsión u otra forma bien conocida por los especialistas en el arte. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19ª edición, (Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1995). Para las formas de dosificación tópica no atomizables, generalmente se emplean formas entre viscosas y semisólidas o sólidas, que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica, y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitaciones, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y semejantes. En una forma de realización, dichas formulaciones fueron esterilizadas o se mezclaron con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, soluciones amortiguadoras o sales) para afectar diversas propiedades, tal como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol rociables, donde el ingrediente activo, por ejemplo, en combinación con un vehículo sólido o líquido inerte, es envasado en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como FREON®) o en una botella lavadora o de compresión. Si se lo desea, también pueden agregarse hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la inyección comprende una administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en la forma de un aerosol, rocío, niebla o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse convenientemente bajo la forma de una presentación como rocío en aerosol, a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de

carbón u otro gas apropiado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada con una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, por gelatina) pueden formularse para usar en un inhalador o un insuflador que contenga una mezcla del polvo del compuesto con una base de polvo apropiada, tal como lactosa o almidón.

Si el método comprende la administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en forma de tabletas, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones, y semejantes. Las tabletas o las cápsulas pueden prepararse por medios convencionales, con agentes excipientes aceptables para el uso farmacéutico, tales como agentes unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato sódico de almidón); o agentes de humectación (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, no taxativamente, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de usarlas. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse usando medios convencionales con aditivos aceptables para el uso farmacéutico, tal como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para una administración oral pueden formularse convenientemente para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos.

El método puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, con el uso de un inhalador o un nebulizador, de una composición formulada con un agente para la aplicación en aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078 y las Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una forma de realización específica, un anticuerpo, una terapia combinada y/o una composición se administran usando la tecnología para administrar drogas en el pulmón Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts).

El método puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o recipientes con dosificaciones múltiples) con adición de un conservante. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos al aceite o acuosos, y pueden contener agentes de la formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede tomar la forma de un polvo para reconstituir con un vehículo apropiado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de usarlo.

Además, los métodos pueden comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (por ejemplo, como una sal moderadamente soluble).

Los métodos abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Entre las sales aceptables para el uso farmacéutico se incluyen aquellas formadas con aniones, tales como aquellos

derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etcétera, y aquellos formados con cationes, tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etcétera.

Por lo general, los ingredientes de las composiciones se proveen en forma separada o mezclados en una unidad de forma de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un saché donde se indica la cantidad de agente activo. En los casos en que el modo de administración sea la infusión, la composición podrá administrarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el modo de administración es por inyección, puede proveerse una ampolla de agua para inyección o salina estéril para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En una forma de realización, se provee uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas envasadas en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o saché donde se indica la cantidad del agente. En una forma de realización, dichos uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas, son suministrados como un polvo liofilizado seco esterilizado o un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado y puede reconstituirse (por ejemplo, con agua o salina) a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. En una forma de realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas son suministrados como un polvo liofilizado seco estéril en un recipiente herméticamente sellado a una unidad dosificación de al menos 5 mg aproximadamente, al menos 10 mg aproximadamente, al menos 15 mg aproximadamente, al menos 25 mg aproximadamente, al menos 35 mg aproximadamente, al menos 45 mg aproximadamente, al menos 50 mg aproximadamente, al menos 75 mg aproximadamente o al menos 100 mg aproximadamente. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas deberían guardarse a una temperatura de entre

2° C y 8° C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas, de la invención deberían administrarse dentro de una 1 semana aproximadamente, dentro de los 5 días aproximadamente, dentro de las 72 horas aproximadamente, dentro de las 48 horas aproximadamente, dentro de las 24 horas aproximadamente, dentro de las 12 horas aproximadamente, dentro de las 6 horas aproximadamente, dentro de las 5 horas aproximadamente, dentro de las 3 horas aproximadamente o dentro de 1 hora aproximadamente después de su reconstitución. En una forma de realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas, se proveen en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente en el que se indica la cantidad y la concentración del agente. En una forma de realización, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado a por lo menos 0,25 mg/ml aproximadamente, al menos 0,5 mg/ml aproximadamente, al menos 1 mg/ml aproximadamente, al menos 2,5 mg/ml aproximadamente, al menos 5 mg/ml aproximadamente, al menos 8 mg/ml aproximadamente, al menos 10 mg/ml aproximadamente, al menos 15 mg/kg aproximadamente, al menos 25 mg/ml aproximadamente, al menos 50 mg/ml aproximadamente, al menos 75 mg/ml aproximadamente o al menos 100 mg/ml aproximadamente. La forma líquida debe almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Las proteínas de unión se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para una administración parenteral. En un aspecto, las proteínas de unión se preparan como una solución inyectable que contiene entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un recipiente, una ampolla o una jeringa de color sílex o ámbar rellena con antelación. La solución amortiguadora puede ser L-histidina (entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 mM), óptimamente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 mM, a pH entre 5,0 y 7,0 (óptimamente a pH 6,0 aproximadamente). Otras soluciones amortiguadoras adecuadas incluyen, sin limitaciones, succinato de sodio, citrato de sodio,

fosfato de sodio o fosfato de potasio. Puede usarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de entre aproximadamente 0 y aproximadamente 300 mM (por ejemplo, aproximadamente a 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente entre aproximadamente 0 y aproximadamente 10% de sacarosa (por ejemplo, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de relleno para una forma de dosificación liofilizada, principalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10% de manitol (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4%). Pueden usarse estabilizadores en formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente entre aproximadamente y aproximadamente 50 mM de L-metionina (preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 mM). Otros agentes de relleno adecuados incluyen glicina, arginina, que se pueden incluir como polisorbato-80 entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,05% (preferiblemente entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,01%). Entre los agentes tensioactivos adicionales, se incluyen, no taxativamente, el polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ.

Las composiciones pueden tomar diversas formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidas. Las composiciones típicas toman la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. En una forma de realización, el modo de administración preferido es el parenteral (por ejemplo, las vías intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una forma de realización, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra forma de realización, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Típicamente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de éste) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes de los que se enumeraron previamente, según se lo requiera, a lo que sigue una esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que necesarios enumerados con anterioridad. En el caso de los polvos estériles y los liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación comprenden secado por vacío y secado por rociado, que proporciona un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional que se desee, a partir de una solución de previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de agentes tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede efectuarse incluyendo en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, un ejemplo de ruta/el modo de administración comprende inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como podrán apreciar aquellos versados en la técnica, la ruta y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. En ciertas formas de realización, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas

de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por aquellos versados en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En determinadas formas de realización, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden incluirse en cápsulas de gelatina dura o blanda, presionar en comprimidos o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usar en forma de tabletas masticables, tabletas para disolución bucal, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y semejantes. Para administrar un compuesto por otra vía que no sea la parenteral puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material que impida su inactivación.

También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos adicionales. En determinadas formas de realización, la proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) o una porción de unión al antígeno de ésta, está co-formulada con y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son de utilidad para el tratamiento de trastornos en los cuales la actividad del TNF- α es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hTNF- α o una porción de unión al antígeno se pueden coformular y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros blancos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Aun más, puede usarse uno o más anticuerpos en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos precedentes. Dichas terapias combinadas pueden emplear ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de esa manera posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias.

En determinadas formas de realización, un anticuerpo contra TNF- α o un fragmento de éste está unido a un vehículo extensor de la vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, sin limitaciones, el dominio Fc, el polietilenglicol y el dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N° 6660843 y en la publicación PCT N° WO 99/25044.

En una forma de realización específica, las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de una proteína de unión u otro agente profiláctico o terapéutico son administradas con el fin de tratar, prevenir, manejar o aliviar un trastorno o uno o más de sus síntomas por medio de una terapia de genes. La terapia de genes hace referencia a una terapia que comprende la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede expresarse. En esta forma de realización, los ácidos nucleicos producen uno o más de sus polipéptidos de unión codificados o el agente profiláctico o terapéutico codificado, que produce un efecto profiláctico o terapéutico.

Es posible usar cualquier método de terapia génica disponible en la técnica. Para hallar revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al. Por revisiones generales de los métodos de terapias génicas, véase Goldspiel et al., (1993) *Clin. Pharm.* 12: 488-505; Wu y Wu (1991) *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev (1993) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan (1993) *Science* 260: 926- 932; y Morgan y Anderson (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; Robinson, C. (1993) *Trends Biotechnol.*, 11(5): 155. Los métodos de uso común en el contexto de la tecnología del ADN recombinante se describen en Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, *Gene Transfer y Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, Nueva York (1990). Se divulgan con descripciones detalladas de diversos métodos de terapia génica en US 2005/0042664.

El TNF- α participa en las patologías asociadas a diversas enfermedades que tienen elementos inmunes e inflamatorios, tales como las enfermedades autoinmunes, particularmente las que están asociadas a la inflamación, que

incluyen la enfermedad de Crohn, la psoriasis (que abarca la psoriasis con placas), la artritis (que abarca la artritis reumática, la artritis psoriática, la osteoartritis y la artritis idiopática juvenil), la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, la espondilitis anquilosante, la diabetes (que abarca la diabetes mellitus insulino dependiente y la diabetes autoinmune), las alergias y la uveítis autoinmune. Como consecuencia, las proteínas de unión de la presente pueden emplearse para tratar estos trastornos. En otra forma de realización, el trastorno es un trastorno respiratorio, tal como el asma, que puede ser alérgico o no alérgico y que puede deberse a una infección, tal como una infección del virus sincicial respiratorio (RSV), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), las afecciones relacionadas con las inflamaciones en las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis, la producción excesiva de moco, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar, los trastorno atópicos, la dermatitis atópica, la urticaria, el eccema, la rinitis alérgica, la enterogastritis alérgica, las afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel, las afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de los órganos gastrointestinales, las enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), la colitis ulcerosa, las afecciones inflamatorias y/o autoinmunes del hígado, la cirrosis hepática, la fibrosis hepática, la fibrosis hepática provocada por virus de la hepatitis B y/o C, el escleroderma, los tumores o los cánceres, el carcinoma hepatocelular, el glioblastoma, el linfoma, el linfoma de Hodgkin, las infecciones de virus, las infecciones de bacterias, las infecciones de parásitos, las infecciones del HTLV-1, la supresión de la manifestación de las respuestas inmunes de protección del tipo 1, la supresión de la manifestación de las respuestas inmunes de protección del tipo 1 durante la vacunación, las enfermedades neurodegenerativas, la regeneración de las neuronas y las lesiones en la médula espinal.

El $\text{TNF-}\alpha$ también puede participar en la patología asociada a las enfermedades que tienen elementos inmunes e inflamatorios. Estas enfermedades incluyen, sin limitaciones, síndrome de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida; anemia perniciosa adquirida; síndromes

coronarios agudos; dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor);
 polineuritis idiopática aguda; enfermedad inmune aguda asociada con el
 trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el
 trasplante de órganos; polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda;
 isquemia aguda; enfermedad hepática aguda; fiebre reumática aguda; mielitis
 transversa aguda; enfermedad de Addison; síndrome de dificultad respiratoria
 de adultos (agudo); enfermedad de Still del adulto; cirrosis alcohólica; daño
 hepático inducido por alcohol; enfermedades alérgicas; alergia; alopecia;
 alopecia areata; mal de Alzheimer; anafilaxis; espondilitis anquilosante;
 enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante; síndrome de
 anticuerpo anti-fosfolípido; anemia aplásica; arteriosclerosis; artropatía; asma;
 enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis; aterosclerosis; alergia atópica;
 eczema atópica; dermatitis atópica; hipotiroidismo autoinmune atrófico;
 enfermedad bullosa autoinmune; dermatitis autoinmune; diabetes autoinmune;
 trastorno autoinmune asociado con una infección por Streptococcus;
 enteropatía autoinmune; anemia hemolítica autoinmune; hepatitis autoinmune;
 pérdida de la audición autoinmune; síndrome linfoproliferativo autoinmune
 (ALPS); hipoglucemia hipoglucemia autoinmune; miocarditis autoinmune;
 neutropenia autoinmune; falla ovárica prematura autoinmune; trombocitopenia
 autoinmune (AITP); enfermedad tiroide autoinmune; uveítis autoinmune;
 bronquiolitis obliterans; enfermedad de Behçet; blefaritis; bronquiectasia;
 penfigoide bullosa; caquexia; enfermedad cardiovascular; síndrome
 antifosfolípido catastrófico; enfermedad celíaca; espondilosis cervical; clamidia;
 coleostasis; hepatitis crónica activa; neumonía eosinofílica crónica; síndrome
 de fatiga crónica; enfermedad inmune crónica asociada con el trasplante de
 órganos; isquemia crónica; enfermedades hepáticas crónicas; candidiasis
 mucocutánea crónica; penfigoide cicatrizal; síndrome clínicamente aislado
 (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple; inmunodeficiencia común variada
 (hipogammaglobulinemia variable común); enfermedad pulmonar intersticial
 asociada con enfermedades del tejido conectivo; conjuntivitis; anemia
 hemolítica Coombs positiva; trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad
 pulmonar obstructiva crónica (COPD); enfermedad de Crohn; hepatitis

autoinmune criptogénica; alveolitis fibrosante criptogénica; dacriocistitis; depresión; dermatitis, esclerodermia; dermatomiositis; enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis; retinopatía diabética; diabetes mellitus; cardiomiopatía dilatada; lupus eritematoso discoide; hernia de disco; prolapso de disco; coagulación intravascular diseminada; hepatitis inducida por drogas; enfermedad pulmonar intersticial inducida por drogas; anemia hemolítica inmune inducida por drogas; endocarditis; endometriosis; endoftalmitis; sinovitis enteropática; episcleritis; eritema multiforme; eritema multiforme mayor; esterilidad femenina; fibrosis; enfermedad pulmonar fibrótica; penfigoide gestacional; arteritis de células gigantes (GCA); glomerulonefritis; hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto); síndrome de Goodpasture; artritis gotosa; enfermedad de injerto versus huésped (GVHD); enfermedad de Grave; infección por estreptococos grupo B (GBS); síndrome de Guillain-Barré (BGS); enfermedad pulmonar asociada a hemosiderosis; fiebre del heno; insuficiencia cardíaca; anemia hemolítica; púrpura de Henoch-Schoenlein; hepatitis B; hepatitis C; síndrome de Hughes; corea de Huntington; hipertiroidismo; hipoparatiroidismo; leucopenia idiopática; trombocitopenia idiopática; mal de Parkinson idiopática; neumonía intersticial idiopática; enfermedad hepática idiosincrática; alergia mediada por IgE; anemia hemolítica inmune; miositis por cuerpos de inclusión; enfermedades infecciosas; enfermedad inflamatoria infecciosa ocular; enfermedad de intestino inflamatorio; enfermedad inflamatoria desmielinizante; enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón; diabetes mellitus dependiente de insulina; pneumonitis intersticial; IPF/UIP; iritis; artritis crónica juvenil; anemia perniciosa juvenil; artritis reumatoide juvenil (JRA); enfermedad de Kawasaki; queratitis; queratoconjuntivitis seca; enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier; parálisis de Landry; histiocitosis de las células de Langerhan; enfermedad por IgA lineal; *Livido reticularis*; artritis de Lyme; enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante; degeneración macular; esterilidad masculina idiopática o NOS; formas malignas; vasculitis microscópica de los riñones; poliangiitis microscópica; enfermedad pulmonar mixta asociada con enfermedades del tejido conectivo; Morbus Bechterev; trastornos de las

neuronas motoras; penfigoide de la membrana mucosa; esclerosis múltiple (todos los subtipos: primario progresivo, secundario progresivo, en recaída, en remisión, etc.); insuficiencia de múltiples órganos; encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*; miastenia gravis; síndrome mielodisplásico; infarto de miocardio; miocarditis; síndrome nefrótico; trastornos de las raíces nerviosas; neuropatía; esteatohepatitis no alcohólica; hepatitis no A no B; neuritis óptica; rechazo de trasplante de órganos; osteoartritis; osteolisis; cáncer de ovario; insuficiencia de ovario; pancreatitis; enfermedades parasitarias; mal de Parkinson; JRA pauciarticular; penfigoide; pénfigo foliácea; pénfigo vulgar; enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD); enfermedad vascular periférica (PVD); enfermedad arterial periférica (PAD); uveítis facogénica; flebitis; poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa); policondritis; polimialgia reumática; poliosis; JRA poliarticular; síndrome de deficiencia poliendócrina; polimiositis; deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II; polimialgia reumática (PMR); enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa; enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria; síndrome postbomba; insuficiencia ovárica prematura; cirrosis biliar primaria; mixoedema primaria; Parkinsonismo primario; colangitis esclerosante primaria; hepatitis esclerosante primaria; vasculitis primaria; cáncer de próstata y rectal y hematopoyéticas formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma); prostatitis; psoriasis; psoriasis tipo 1; psoriasis tipo 2; artritis psoriática; artropatía psoriática; hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo; manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa; aplasia de glóbulos rojos pura; insuficiencia adrenal primaria; fibrosis por radiación; artritis reactiva; enfermedad de Reiter; neuromielitis óptica recurrente; enfermedad renal NOS; restenosis; artritis reumatoide; enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide; enfermedad del corazón reumático; SAPHO (sinovitis; acne; pustulosis; hiperostosis y osteítis); sarcoidosis; esquizofrenia; síndrome de Schmidt; esclerodermia; amiloidosis secundaria; pulmón de shock; escleritis; ciática; insuficiencia adrenal secundaria; síndrome de sepsis; artritis séptica; shock séptico; artropatía seronegativa; enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas; enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de

Sjögren; síndrome de Sjögren; dermatosis de Sneddon-Wilkinson; autoinmunidad del esperma; espondiloartropatía; espondilitis anquilosante; síndrome de Stevens-Johnson (SJS); enfermedad de Still; accidente cerebrovascular; oftalmia simpática; síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; lupus eritematoso sistémico; enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico; esclerosis sistémica; enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica; enfermedad/arteritis de Takayasu; arteritis temporal; enfermedades mediadas por Tipo Th2 y Tipo Th1; tiroiditis; síndrome de shock tóxico; retinitis toxoplásmica; necrólisis epidérmica tóxica; mielitis transversa; TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1 (TNFR)); resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans; reacción alérgica de Tipo 1; hepatitis autoinmune de tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica); hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis por anticuerpos anti-LKM); diabetes de Tipo II; artropatía colítica ulcerosa; colitis ulcerosa; urticaria; neumonía intersticial usual (UIP); uveítis; enfermedad pulmonar vasculítica difusa; vasculitis; conjuntivitis vernal; retinitis viral; vitiligo; síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH); granulomatosis de Wegener; degeneración macular húmeda; cicatrización de heridas; artropatía por *Yersinia* y *Salmonella*.

Las proteínas de unión al TNF- α , o las porciones de unión al antígeno de éstas, pueden usarse solas o en combinación con el propósito de tratar las enfermedades mencionadas, lo que abarca las combinaciones con aquellos agentes terapéuticos convencionales que son útiles en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Ha de comprenderse que las proteínas de unión, o las porciones de unión al antígeno de éstas, pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde dicho agente adicional es seleccionado por aquellos versados en la técnica en función del propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o la afección que se está tratando con el anticuerpo. El agente adicional también puede ser un agente que confiere un atributo benéfico a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que

afecta la viscosidad de la composición.

Las combinaciones incluyen las proteínas de unión al TNF- α , o fragmentos de unión al antígeno de éstas, que se describen en la presente y al menos un agente adicional enumerado más adelante. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición que se forma puede llevar a cabo la función que se le ha destinado.

En una forma de realización, las combinaciones incluyen las proteínas de unión al TNF- α , o fragmentos de unión al antígeno de éstas, y un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo, que puede unirse a la IL-12 humana, PGE2, LPA, el NGF, CGRP, SubP, RAGE, histamina, un bloqueador de los receptores de histamina, bradiquinina, IL-1 α , IL-1 β , el VEGF, el PLGF, metotrexato, un corticosteroide, un modulador de los receptores de glucocorticoides, ciclosporina, rapamicina, FK506 o un agente antiinflamatorio no esteroidal.

En otra forma de realización, los ejemplos de combinaciones incluyen las proteínas de unión al TNF- α , o fragmentos de unión al antígeno de éstas, descritas en la presente y una o más drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs), tales como, por ejemplo, ibuprofeno. Otros ejemplos de combinaciones comprenden los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de éstos, descritos en la presente y corticosteroides incluyendo prednisolona. Los efectos secundarios del uso de esteroides se pueden reducir o eliminar disminuyendo la dosis requerida de esteroide cuando los pacientes son tratados con las proteínas de unión anti-TNF- α . Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para artritis reumática con los cuales pueden combinarse un anticuerpo, o porción de anticuerpo, incluyen los que se detallan a continuación: las drogas antiinflamatorias que suprimen las citoquinas (CSAID), los anticuerpos o los antagonistas que presentan actividad contra otras citoquinas u otros factores de crecimiento humanos, por ejemplo, el TNF, LT, la IL-1 α , la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-15, la IL-16, la IL-18, la IL-21, los interferones, EMAP-II, GM-CSF, el FGF, el PDGF, los

miembros de la familia del TNF, por ejemplo, TRAIL, FASL, APRIL, etcétera, y los mediadores lipídicos que participan en determinadas enfermedades, tales como las prostaglandinas, por ejemplo, PGE2, S1P, LPA, etcétera. Otros mediadores de enfermedades incluyen la esclerostina, el NGF, la sustancia P, CGRP y otros mediadores del dolor. Los anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden combinar con las proteínas de unión al TNF- α , o fragmentos de unión al antígeno de éstas, interfieren en diferentes puntos en la cascada autoinmune e inflamatoria subsiguiente, por ejemplo, antagonistas del TNF tipo quimérico, anticuerpos TNF humanizados o humanos, D2E7, (publicación PCT N° WO 97/29131), CA2 (REMICADE™), CDP 571 y receptores del TNF p55 soluble o p75, derivados de éstos (p75TNFR1gG (ENBREL™) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertidora del TNF- α (TACE) y otros inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora interleuquina-1, IL-1RA etc.). Otros agentes que se pueden combinar con los anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de éstos, incluyen interleuquina 11, agentes que actúan en paralelo, dependientes o conjuntamente con la función de el TNF- α tal como, por ejemplo, antagonistas de IL-18 (por ejemplo, proteínas de unión a IL-18 tales como, por ejemplo, anticuerpos o receptores solubles de IL-18, o fragmentos de unión al antígeno de éstos. Los agentes adicionales que se pueden combinar con los anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de éstos, incluyen inhibidores anti-CD4 no supresores, antagonistas de la vía co-estimulante CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles, ligandos antagonistas o fragmentos de unión al antígeno de éstos.

Las proteínas de unión, o porciones de unión al antígeno de éstas, también se pueden combinar con agentes para el tratamiento de artritis reumatoide por ejemplo, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina

sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, penicilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticosteroides (oral, inhalados y por inyección local), agonistas del adrenorreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α o IL-1 (por ejemplo inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1beta, inhibidores de la enzima convertidora del TNF- α (TACE), inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas y derivados de éstos (por ejemplo receptores del TNF solubles, p55 o p75 y los derivados p75TNFRlgG (Enbrel™ y p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFbeta), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxicloroquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato de oro y sodio, aspirina, triamcinolona acetona, napsilato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenac, piroxicam, etodolac, diclofenac sódico, oxaprozina, clorhidrato de oxicodona, bitartrato de hidrocodona/apap, diclofenac sódico/misoprostol, fentanilo, anakinra recombinante humano, clorhidrato de tramadol, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, sulfato de glucosamina/condroitina, clorhidrato de amitriptilina, sulfadiazina, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-

548, VX740, Roflumilast, IC-485, CDC-801 y Mesopram.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la enfermedad de intestino inflamatorio con los cuales se puede combinar una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que siguen: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de la lipooxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores del tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de la elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de éstos, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 y sus ligandos. Las proteínas de unión, o porciones de unión al antígeno de éstos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, lefunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 α , inhibidores de la enzima convertidora del TNF α , inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas y derivados de éstos (por ejemplo, los receptores solubles del TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RI, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL13 y TGF α).

Los ejemplos de agentes terapéuticos para tratar la enfermedad de Crohn con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α como las que se describen en la presente, o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: los antagonistas del TNF, por ejemplo, los anticuerpos anti-TNF, D2E7 (Publicación PCT N° WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, las construcciones inhibidoras de TNFR-Ig (p75TNFR-IgG (ENBREL®) y p55TNFR-IgG (Lenercept)), otros antagonistas del TNF, por ejemplo, Golimumab (Simponi), y los inhibidores de PDE4. Las proteínas de unión, o porciones de unión al antígeno de éstos, se pueden combinar con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de unión, o las porciones de unión al antígeno de éstas, también pueden combinarse con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o la acción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 α e IL-1RA. Las proteínas de unión, o una porción de unión al antígeno de éste, también puede usarse con inhibidores de la señalización de células T, por ejemplo, inhibidores de tirosina de las quinasa 6-mercaptopurinas. Las proteínas de unión, o porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con la IL-11. Las proteínas de unión, o porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, metilprednisolonsuccinato de sodio, difenoxilato/sulfato de atropina, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, clorhidrato de ciprofoxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, polícarbofilo, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, clorhidrato de colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferón-gamma.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar la

esclerosis múltiple con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: los corticosteroides, las prednisolona, la metilprednisolona, la azatioprina, la ciclofosfamida, la ciclosporina, el metotrexato, la 4-aminopiridina, la tizanidina, el interferón- α 1a (AVONEX®; Biogen), el interferón- α 1b (BETASERON®; Chiron/Berlex), el interferón- α -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), el interferón- α (Alfa Wassermann/J&J), el interferón- α -1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), el Peg el interferón- α -2b (Enzon/Schering-Plough), el copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE®; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.), el oxígeno hiperbárico, las inmunoglobulinas intravenosas, la clabribina y los anticuerpos, los antagonistas o los inhibidores que presentan actividad contra otras citoquinas u otros factores de crecimiento humanos, o contra sus receptores, por ejemplo, el TNF, LT, IL-1 α , la IL-2, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-1A, la IL-15, la IL-16, la IL-18, EMAP-II, GM-CSF, el FGF y el PDGF. Los anticuerpos, o las porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90, o sus ligandos. Los anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de éstos, también se pueden combinar con agentes, tales como FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasas), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1b, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquinas solubles y derivados de éstos (por ejemplo, receptores del TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF α), COPAXONE® y

inhibidores de caspasa, por ejemplo inhibidores de caspasa-1.

Las proteínas de unión al TNF- α , o las porciones de unión a antígeno de éstas, también pueden combinarse con agentes tales como alemtuzumab, dronabinol, unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, Anergix.MS, antagonistas del receptor de quimioquina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista de cannabinoides) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo contra el receptor de anti-IL-6, neurovax, pirfenidone allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas del interferón gamma, agonistas de IL-4.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la angina con los cuales puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbide, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbide, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina cálcica, cloruro de potasio, furosemide, simvastatina, verapamil HCl, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparin sódico, heparina sódica, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimibe, bumetanide, losartan potásico, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril y fumarato de bisoprolol.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la espondilitis anquilosante con los que puede combinarse una proteína de unión, o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: ibuprofeno, diclofenac, misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenac, celecoxib, rofecoxib, sulfasalazina, metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept e infliximab.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o

prevenir el asma con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sódico, propionato de flicasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, clorhidrato de levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, prednisolona fosfato sodio, triamcinolona acetona, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de la influenza, amoxicilina trihidrato, flunisolida, inyección por alergia, cromolín sódico, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo asistente de inhaladores, guaifenesina, fosfato sódico de dexametasona, clorhidrato de moxifloxacina, doxiciclina hidrato, guaifenesina/d-metorfan, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, clorhidrato de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, clorhidrato de cetirizina/pseudoefedrina, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sodio, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona y sulfato de metaproterenol.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la COPD con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, metilprednisolona succinato sodio, montelukast sodio, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetona, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, clorhidrato de levalbuterol, flunisolida, ceftriaxona sódica, amoxicilina trihidrato, gatifloxacina, zafirlukast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, sulfato de metaproterenol, metilprednisolona, furoato de mometasona, p-efedrina/cod/clorfenir, acetato de pirbuterol, p-efedrina/loratadina, sulfato de terbutalina, bromuro de tiotropio,

(R,R)-formoterol, TgAAT, cilomilast y rofumilast.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir el HCV con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa con 1, interferón-alfa-n1, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-2b pegilado, ribavirina, peginterferón alfa-2b + ribavirina, ácido ursodesoxicólico, ácido glicirrízico, timalfasina, maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que se use para tratar el HCV por medio de la intervención con los siguientes blancos: la polimerasa del HCV, la proteasa del HCV, la helicasa del HCV y el IRES (sitio de ingreso interno al ribosoma) del HCV.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la fibrosis pulmonar idiopática con los que puede combinarse una proteína de unión, o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, succinato sódico de metilprednisolona, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, oxicodona HCl, cloruro de potasio, tramcinolona, acetonida, tacrolimus anhidro, calcio, interferón alfa, metotrexato, micofenolato, mofetil e interferón gamma 1b.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir el infarto de miocardio con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparin sódico, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbide, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavase, losartan potásico, quinapril HCl/mag carb, bumetanida, alteplase, enalaprilat, clorhidrato

de amiodarona, tirofiban HCl m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captoprilo, irbesartan, valsartan, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolin sódico, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, dobutamina HCl, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina cálcica, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbide, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimibe/simvastatina, avasimibe, y cariporide.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la psoriasis con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: calcipotrieno, propionato de clobetasol, triancinolona acetona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonide, betametasona diprop aumentada, fluocinolona acetona, acitretin, champú de alquitrán, valerato de betametasona, mometasona furoato, ketoconazol, pramoxine/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenolide, urea, betametasona, clobetasol propionato/emoll, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula humectante, ácido fólico, desonide, pimecrolimus, alquitrán de carbón, diacetato de diflorasona, etanorcept folato, ácido láctico, metoxsalen, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, pantalla solar, halcinonide, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de carbón mineral, alquitrán de carbón/ácido salicílico, alquitrán de carbón/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonide/emoliente, aceite mineral/aceite de castor/na lact, aceite mineral/aceite de maní, petróleo/miristato de isopropilo, psoralen, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, y sulfasalazina.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la artritis psoriática con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: metotrexato, etanorcept, rofecoxib, celecoxib, ácido

fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomide, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxycloquin, prednisona, sulindac, betametasona diprop aumentada, infliximab, metotrexato, folato, triancinolona acetona, diclofenac, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenac sódico, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetín sódico, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenac sódico/misoprostol, fluocinonide, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, hidrocodona bitartrato/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept y efalizumab.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la restenosis con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, ABT-578y acetaminofeno.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la ciática con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, incluyen los que se detallan a continuación: hidrocodona bitartrato/apap, rofecoxib, ciclobenzaprina HCl, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, oxicodona HCl/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, tramadol HCl/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenac sódico, gabapentin, dexametasona, carisoprodol, ketorolac trometamina, indometacina, acetaminofeno, diazepam, nabumetona, oxicodona HCl, tizanidina HCl, diclofenac sódico/misoprostol, propoxifeno napsilato/apap, asa/oxicod/oxicodona ter, ibuprofeno/hidrocodona bit, tramadol HCl, etodolac, propoxifeno HCl, amitriptilina HCl, carisoprodol/codeína fos/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, y temazepam.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir el lupus eritematoso sistémico (SLE) con los que puede combinarse una proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta,

incluyen los que se detallan a continuación: NSAID, por ejemplo, diclofenac, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX₂, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; drogas anti-malaria, por ejemplo, hidroxicloroquina; esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, metotrexato; inhibidores de PDE4 o un inhibidor de la síntesis de purinas, por ejemplo, Cellcept®. Las proteínas de unión o porciones de unión al antígeno de éstos, también se pueden combinar con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, imurán y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 α e IL-1ra. Las proteínas de unión, o una porción de unión al antígeno de éste, también pueden usarse con inhibidores de la señalización de células T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa; o moléculas dirigidas a moléculas de activación de células T, por ejemplo, CTLA-4-IgG o anticuerpos de la familia anti-B7 y anticuerpos de la familia anti-PD-1. Las proteínas de unión, o porciones de unión al antígeno de éstos, se pueden combinar con IL-11 o anticuerpos anti-citoquina, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFN γ) o anticuerpos anti-receptor receptor, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos contra moléculas B de la superficie celular. Las proteínas de unión, o una porción de unión al antígeno de éstas, también pueden usarse con LJP 394 (abetimus), agentes que reducen o inactivan las células B, por ejemplo, rituximab (anticuerpo anti-CD20), linfofostato-B (anticuerpo anti-B1yS), antagonistas del TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, D2E7 (publicación PCT N° WO 97/29131 1; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, construcciones del TNFR-Ig (p75TNFR-IgG (ENBREL®) y p55TNFR-IgG (LENERCEPT)).

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una “cantidad eficaz para el uso terapéutico” o una “cantidad eficaz para el uso profiláctico” de una proteína de unión al TNF- α o de una porción de unión al antígeno de ésta. Una “cantidad eficaz para el uso terapéutico” hace referencia a una cantidad eficaz,

a dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión, o una porción de unión al antígeno de ésta, descrita en la presente, puede ser determinada por un especialista en el arte y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, para generar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o de una porción de unión al antígeno de éste, es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad eficaz para el uso profiláctico” hace referencia a una cantidad eficaz, a dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad eficaz para el uso profiláctico será menor que la cantidad eficaz para el uso terapéutico.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según lo indican las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y mayor uniformidad de dosificación. La forma de dosificación individual hace referencia a unidades físicamente discretas, apropiadas para dosificaciones individuales en los sujetos mamíferos a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico que se requiera. La especificación para la forma de dosificación individual está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de las

composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Un ejemplo, no limitativo, de un rango para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de la proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión al antígeno de ésta, de la invención comprende entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/kg. Los valores de la dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a aliviar. Para cualquier sujeto particular, se deberían ajustar los regímenes de dosificación específicos en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el buen juicio profesional de la persona encargada de administrar o supervisar la administración de las composiciones. Los rangos de dosificación indicados en la presente solamente se ofrecen a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Para aquellos versados en la técnica, ha de ser evidente que es posible realizar modificaciones y adaptaciones apropiadas a las composiciones y los métodos que se describen en la presente usando equivalentes apropiados, sin apartarse del alcance de la divulgación o las formas de realización que se describen en la presente documentación. Las presentes formas de realización se comprenderán con mayor claridad con referencia a los siguientes ejemplos, que solamente se incluyen a efectos ilustrativos y no pretenden ser limitantes en modo alguno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α humano

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-TNF- α humano se obtuvieron como se detalla a continuación.

Ejemplo 1.1. Inmunización de los ratones con antígenos del TNF- α humano

Se inyectaron 20 microgramos del TNF- α humano recombinante purificado (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) mezclado con adyuvante de Freund completo o con el adyuvante Immunoeasy (Qiagen, Valencia, CA) por

vía subcutánea en cinco ratones Balb/C de 6-8 semanas, cinco ratones C57B/6 y cinco ratones AJ el Día 1. Los días 24, 38 y 49, se inyectaron veinte microgramos del TNF- α de antígeno humano recombinante purificado mezclado con adyuvante de Freund incompleto o adyuvante Immuneasy por vía subcutánea en los mismos ratones. El día 84 o el día 112 o el día 144, los ratones reciben inyecciones por vía intravenosa con 1 μ g del antígeno humano recombinante purificado del TNF- α .

Ejemplo 1.2. Generación de un hibridoma

Se fusionaron los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados que se describen en el Ejemplo 1.1 con células SP2/O-Ag-14 a una relación de 5:1 de acuerdo con el método establecido que se describe en Kohler, G. y Milstein (1975), *Nature*, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se plaquean en medio de selección que contiene azaserina e hipoxantina en placas de 96 cavidades a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células de bazo por cavidad. Siete a diez días después de la fusión, se observan colonias de hibridomas macroscópicas. Se somete el sobrenadante de cada cavidad que contiene colonias de hibridomas a un análisis de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra el TNF- α . Posteriormente, los sobrenadantes que presentan una actividad específica del TNF- α son sometidos a una evaluación adicional para determinar su capacidad de neutralizar el TNF- α en un bioensayo L929 (que se describe en el ejemplo 2.7).

Ejemplo 1.3. Identificación y caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-TNF- α humano

Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen al TNF- α y que pueden unirse específicamente TNF- α , y particularmente aquellos que presentan valores de la IC₅₀ en el bioensayo L929 de 5 nM o menos, son llevados a una escala mayor y son clonados por medio de una dilución limitativa.

Las células de hibridoma se expanden en un medio que contiene suero fetal bovino bajo en IgG 10% (Hyclone N° SH3015 1, Logan, UT.). En promedio, se cosechan 250 ml del sobrenadante de cada hibridoma (que deriva

de una población clonal), se los concentra y se los purifica por medio de una cromatografía de afinidad con la proteína A. La capacidad de los anticuerpos monoclonales purificados de inhibir la actividad del TNF- α se determina usando el bioensayo L929, que se describe en el ejemplo 2.7.

Ejemplo 1.4. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la región variable para cada anticuerpo monoclonal del TNF- α anti-humano de murinos

Para cada determinación de secuencia de aminoácidos, se aíslan aproximadamente 10×10^6 células de hibridoma por centrifugación y se procesan para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) según las instrucciones del proveedor. El ARN total es sometido a síntesis de la primera cadena de ADN usando el sistema de síntesis de la primera cadena SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del proveedor. Se usa Oligo(dT) como cebador para la síntesis de la primera cadena para seleccionar el ARN poli(A)*. El producto de ADNc de la primera cadena se amplifica luego por PCR con cebadores diseñados para la amplificación de regiones variables de inmunoglobulina de murinos (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Los productos de la PCR se resuelven sobre un gel de agarosa, se recortaron, purificaron y luego se subclonaron con el conjunto de elementos para clonación TOPO en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en *E. coli* TOP10 químicamente competente (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se conduce una PCR de colonias con los transformantes para identificar los clones que contienen al inserto. Se aísla el ADN plásmido de los clones que contienen al inserto usando un conjunto de elementos QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos se secuencian en ambas cadenas para determinar las secuencias de ADN de la cadena variable pesada o variable liviana usando los cebadores M13 directo y M13 inverso (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana de los anticuerpos monoclonales anti-TNF- α se detallan en la tabla 5.

Ejemplo 2. Anticuerpos anti TNF- α humano recombinantes

Ejemplo 2.1. Construcción y expresión de anticuerpos anti-TNF- α humano recombinantes quiméricos

Se reemplazó el ADN que codificaba la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-TNF- α humano MAK199 por un fragmento de ADNc que codificaba la región constante de la IgG1 humana, que contenía 2 mutaciones en los aminoácidos de la región de la bisagra. Para ello, se recurrió a una recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones comprenden un cambio de leucina por alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina por alanina en la posición 235 (Lund et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2657). La región constante de la cadena liviana de cada una de estos anticuerpos fue reemplazada por una región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos completos se expresaron de manera transitoria en células HEK293-6E, a través de la transfección concurrente de ADNc quimérico de la cadena pesada y de la cadena liviana unido al plásmido de expresión pHybE (Publicación de Patente de los EEUU N° US 20090239259). Los sobrenadantes celulares que contienen el anticuerpo recombinante quimérico se purificaron por cromatografía en Proteína A Sepharose y el anticuerpo unido se eluyó por adición de solución amortiguadora ácida. Se neutralizaron los anticuerpos y se los dializó en PBS.

Luego se evaluó la capacidad de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-TNF- α humano de unirse a la proteína del hTNF- α con un ELISA, de manera tal de confirmar la unión al antígeno.

Ejemplo 2.2. Construcción de anticuerpos anti-TNF- α humano con CDR injertadas

Se injertan las secuencias CDR de las cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal MAK199 (véase la tabla 5 anterior) aplicando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, en distintas secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas aceptoras.

Sobre la base de los alineamientos de las secuencias VH y VL con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal MAK199, se seleccionan las siguientes secuencias humanas conocidas:

- a) VH1-18 (IGHV1-18), VH7-4.1 (IGHV7-4-1) y las secuencias circundantes de hJH6, con el fin de construir las secuencias aceptoras para la cadena pesada; y
- b) 1-39/O12, 6-D1/A14 y hJK2, con el fin de construir las secuencias aceptoras para la liviana.

Mediante el injerto de las CDR correspondientes de las regiones VH y VL de MAK199 en las secuencias aceptoras mencionadas, fue posible preparar secuencias de regiones VH y VL con CDR injertadas, humanizadas y modificadas (véase también la tabla 6).

Ejemplo 2.3. Construcción de retromutaciones en la región del marco de trabajo de los anticuerpos con CDR injertadas

Para generar retromutaciones del marco en anticuerpos humanizados, se introducen mutaciones en las secuencias de los anticuerpos con injertos de CDR preparados de acuerdo con el ejemplo 2.2, mediante la síntesis *de novo* del dominio variable, y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Se construyen distintas combinaciones de retromutaciones, y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR,, como se indica a continuación. Los números de los residuos para estas mutaciones se basan en el sistema de numeración de Kabat.

Para las cadenas pesadas de hMAK199VH.1z, se retromutan uno o más de los siguientes residuos de la zona de Vernier y de la zona de interacción entre las regiones VH y VL: V2→I e Y91→F.

Las mutaciones adicionales incluyen las que se indican a continuación: Q1→E

Para las cadenas pesadas de hMAK199VH.2z, se retromutan uno o más de los siguientes residuos de la zona de Vernier y de la zona de interacción entre las regiones VH y VL: V2→I, V67→F, M69→F, T71→L e Y91→F.

Las mutaciones adicionales incluyen las que se indican a continuación: Q1→E, R82→S, D85→E.

Para la cadena liviana de hMAK199Vk.1 se retromutan uno o más de los siguientes residuos de la zona de Vernier y de la zona de interacción entre las regiones VH y VL: A43→T, P44→V, F71→Y e Y87→F.

Para la cadena liviana de hMAK199Vk.2 se retromutan uno o más de los siguientes residuos de la zona de Vernier y de la zona de interacción entre las regiones VH y VL: V2→I, A43→T, P44→V, K49→Y, F71→Y e Y87→F.

Ejemplo 2.4. Generación de anticuerpos anti-HTNF- α humanizados que contienen las retromutaciones en la región del marco de trabajo de los anticuerpos con CDR injertadas

Las secuencias pueden utilizarse para sintetizar ácidos nucleicos usando tecnologías de síntesis de ADN o amplificación estándar, y armando los fragmentos del anticuerpo deseados en vectores de expresión, usando tecnología de ADN recombinante estándar, para expresión en células. Por ejemplo, los codones de ácido nucleico se determinan partiendo de las secuencias de aminoácidos y se sintetizan oligonucleótidos de ADN por Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA EEUU Los oligonucleótidos se ensamblan en fragmentos de ADN doble cadena de 300-2000 pares de bases, se clonan en un vector plasmídico y se verifica la secuencia. Los fragmentos clonados se ensamblan usando un proceso enzimático para producir el gen completo y se subclona en un vector de expresión. (Véase 7306914; 7297541; 7279159; 7150969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; y 20030157643).

Por ejemplo, es posible insertar los anticuerpos humanizados contruidos in silico que se describieron con anterioridad en el sitio de clonación múltiple de un vector pHybE (Publicación de Patente de los EEUU N° US 2009/0239259). Se aíslan las colonias bacterianas y se extrae el ADN plásmido; los insertos de ADNc se secuencian por completo. Las cadenas pesadas y livianas humanizadas correctas de cada anticuerpo se transfectan de manera concurrente en células HEK 293-6E para producir de manera transitoria los anticuerpos anti-TNF- α humano humanizados completos. Los vectores pHybE que contienen el ADNc de la cadena pesada injertado y el

ADNc de la cadena liviana injertado se transfectan de manera concurrente en células HEK 293-6E. Los sobrenadantes celulares que contienen el anticuerpo recombinante quimérico se purifican por cromatografía en Proteína A Sepharose y el anticuerpo unido se eluye por adición de solución amortiguadora ácida. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS. Los anticuerpos humanizados se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Anticuerpos anti-TNF- α humanizados

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		123456789012345678901234567890
37	hMAK199VH.1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS GYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADDFKGR FVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR KF LTTVVVTDYAMDY WGQGTTTVTVSS
38	hMAK199VH.1a	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS GYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADDFKGR FVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTAVYFCAR KF LTTVVVTDYAMDY WGQGTTTVTVSS
39	hMAK199VH.1b	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS GYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADDFKGR FVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTAVYFCAR KF LTTVVVTDYAMDY WGQGTTTVTVSS
40	hMAK199VH.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADDFKGR VTMTTDTST TSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR KF

		LTTVVVTDYAMDY WGQGTTVTVSS
41	hMAK199VH.2a	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADDFKGR FTFTLDTS TSTAYMELSSLRSED TAVYFCARKE LTTVVVTDYAMDY WGQGTTVTVSS
42	hMAK199VH.2b	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADDFKGR VTFTTDTTS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARKE LTTVVVTDYAMDY WGQGTTVTVSS
43	hMAK199VL.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRA SQDISNYLNWYQQKPGKTVKLLIYY TSRLQS GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFC QQGNTLPPTFGQ GTKLEIK
44	hMAK199VL.1b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRA SQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY TSRLQS GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC QQGNTLPPTFGQ GTKLEIK
45	hMAK199VL.2a	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRA SQDISNYLNWYQQKPDQTVKLLIYY TSRLQS GVPSRFSGSGSGTDYFTTI SSLEAEDAATYFC QQGNTLPPTFGQ GTKLEIK
46	hMAK199VL.2b	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRA SQDISNYLNWYQQKPDQAPKLLIYY TSRLQS GVPSRFSGSGSGTDYFTTI SSLEAEDAATYYC QQGNTLPPTFGQ GTKLEIK

Ejemplo 2.5. Apareamientos de las regiones VH y VL de los anticuerpos

anti-hTNF- α humanizados hMAK199

ID única de ABT	VH	VL
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2

AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b

Ejemplo 2.6. Determinación de la afinidad usando tecnología BIACORE

Tabla 8. Reactivo usado en los análisis con Biacore

Antígeno	Denominación del proveedor	Proveedor	Nº catálogo
TNF- α	TNF- α humano recombinante TNFSF1A	R&D systems	210-TA

Métodos con BIACORE

El ensayo de BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) permite determinar la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de afinidad y disociación. La unión de los anticuerpos a un antígeno blanco (por ejemplo, un antígeno blanco recombinante purificado) se determinó por mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore® 1000 ó 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando HBS-EP de corrida (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y agente tensioactivo P20 0,005%) a 25° C. Todos los compuestos químicos se obtuvieron de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de lo contrario de una fuente diferente según se describe. Por ejemplo, se inmovilizaron aproximadamente 5000 RU de anti-IgG de ratón de cabra, (Fc γ), anticuerpo policlonal específico del fragmento (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) directamente por medio de un chip biosensor de grado investigación CM5 usando un conjunto de elementos para acoplamiento de aminas estándar de acuerdo con las instrucciones y procedimientos del proveedor a 25 μ g/ml. Los grupos sin reaccionar sobre la superficie del

biosensor se bloquean con etanolamina. Se usa una superficie de carboximetil dextrano modificada en las celdas de flujo 2 y 4 como superficie de reacción. Se usa carboximetil dextrano no modificado sin anti-IgG de ratón de cabra en las celdas de flujo 1 y 3 como superficie de referencia. Para el análisis cinético, se ajustan simultáneamente ecuaciones derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando un análisis de ajuste global) utilizando el software Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados se diluyen en solución amortiguadora salina-HEPES para la captura a través de superficies de reacción específicas de anti-IgG de ratón de cabra. Los anticuerpos que serán capturados como ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre las matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto. Las constantes de asociación y de disociación, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}), se determinan con una velocidad de flujo continuo de 25 µl/minuto. Las constantes se calculan sobre la base de mediciones de la unión cinética que se llevan a cabo con concentraciones del antígeno que varían entre 10 y 200 nM. La constante de disociación del equilibrio (M) de la reacción entre los anticuerpos y el antígeno blanco se calcula luego a partir de las constantes cinéticas según la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. La unión se registra como una función del tiempo y se calculan las constantes cinéticas. En este ensayo, se pueden medir constantes de asociación tan rápidas como $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y disociaciones tan lentas como $10^6 s^{-1}$.

Tabla 9. Análisis de BIACORE de los anticuerpos anti-hTNF- α

ID del anticuerpo	VH	VL	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	k_D (M)
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	2,00E+06	6,80E-04	3,50E-10
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	2,10E+06	9,40E-04	4,50E-10
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	2,00E+06	9,20E-04	4,60E-10
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	2,00E+06	1,00E-03	5,20E-10
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	2,40E+06	1,40E-03	5,90E-10
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	1,30E+06	8,90E-04	6,70E-10

AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	1,90E+06	1,30E-03	6,70E-10
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	1,40E+06	9,70E-04	7,00E-10
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	1,30E+06	9,30E-04	7,30E-10
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	1,20E+06	9,70E-04	7,80E-10
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	1,20E+06	9,80E-04	7,90E-10
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	1,30E+06	1,10E-03	8,30E-10
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	1,40E+06	1,20E-03	8,60E-10
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	1,20E+06	1,10E-03	8,90E-10
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	1,10E+06	1,00E-03	9,10E-10
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	1,60E+06	1,50E-03	9,30E-10
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	1,00E+06	1,00E-03	1,00E-09
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	1,10E+06	1,10E-03	1,00E-09
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	9,40E+05	1,00E-03	1,10E-09
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	1,00E+06	1,20E-03	1,10E-09
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	1,50E+06	1,70E-03	1,20E-09
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	9,50E+05	1,10E-03	1,20E-09
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	9,40E+05	1,20E-03	1,20E-09
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	1,20E+06	1,50E-03	1,30E-09
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	9,00E+05	1,10E-03	1,30E-09
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	1,10E+06	1,40E-03	1,30E-09
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	1,10E+06	1,50E-03	1,40E-09
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	8,80E+05	1,30E-03	1,40E-09
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	8,90E+05	1,60E-03	1,80E-09
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	8,20E+05	1,50E-03	1,80E-09
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	8,60E+05	1,70E-03	1,90E-09
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	7,40E+05	1,50E-03	2,00E-09
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	8,30E+05	1,80E-03	2,10E-09
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	6,60E+05	1,40E-03	2,10E-09
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	8,80E+05	1,90E-03	2,20E-09
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	6,60E+05	1,50E-03	2,30E-09

Se mantuvo la unión de todas las construcciones humanizadas

caracterizada con Biacore y era comparable a la del anticuerpo parental de murinos.

Ejemplo 2.7. Neutralización del TNF- α

Se cultivaron células L929 hasta una densidad semi-confluyente y se las cosechó usando 0,25% de trispina (Gibco#25300). Las células se lavaron con PBS, se contaron y se suspendieron nuevamente hasta alcanzar una concentración de 1E6 células/ml en un medio de ensayo que contenía 4 μ g/ml de actinomicina D. Las células se sembraron en una placa de 96 cavidades (Costar N° 3599), en un volumen de 100 μ l, a razón de 5E4 células/cavidad. Los anticuerpos y la IgG control se diluyeron hasta una concentración 4x en el medio del ensayo, después de lo cual se realizaron diluciones de 1:4 en serie. El hTNF- α se diluyó hasta 400 pg/ml en el medio del ensayo. Se combinó una muestra del anticuerpo (200 μ l) con el hTNF- α (200 μ l) de acuerdo con un esquema con una dilución de 1:2, después de lo cual se incubó durante 0,5 horas a temperatura ambiente.

La solución con el anticuerpo y el TNF- α humano se colocó sobre las células sembradas en un volumen de 100 μ l, de manera tal de alcanzar una concentración final de 100 pg/ml de hTNF- α y el anticuerpo entre 150 nM y 0,0001 nM. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Para determinar la viabilidad, se tomaron 100 μ l de las cavidades y se agregaron 10 μ l del reactivo WST-1 (Roche, cat. N° 11644807001). Las placas se incubaron bajo las condiciones del ensayo durante 3,5 horas. Las placas se leyeron a una OD de 420-600 nm en un lector de placas de ELISA Spectromax 190. En la tabla 10 se detalla la EC50 promedio determinada a partir de diversos ensayos.

Tabla 10. Ensayo de neutralización del TNF- α humano por los anticuerpos anti-hTNF- α humanizados

ID del anticuerpo	VH	VL	IC50 para la neutralización del TNF- α en el ensayo (nM)

AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	1,06
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	0,35
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	0,66
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	ND
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	1,90
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	0,87
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	1,94
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	0,21
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	3,78
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	ND
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	0,82
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	2,11
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	0,32
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	0,35
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	1,52
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	ND
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	0,53
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	1,09
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	>20
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	3,78
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	>20
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	ND
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	>20
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	>20
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	11,45
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	3,65
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	>20
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	ND
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	>20
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	>20
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	5,90

AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	1,19
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	>20
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	ND
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	9,76
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	>20

Todos los anticuerpos anti-hTNF- α neutralizaron el TNF- α en el ensayo de neutralización.

Ejemplo 2.8. Análisis fisicoquímico y estabilidad *in vitro* de los anticuerpos monoclonales humanizados

Cromatografía por exclusión de tamaño

Los anticuerpos se diluyeron hasta 2,5 mg/ml con agua y se analizan 20 ml con un sistema de HPLC Shimadzu usando una columna G3000 SWXL gel TSK (Tosoh Bioscience, N° cat. k5539-05k). Las muestras se eluyeron de la columna con sulfato de sodio 211 mM, fosfato de sodio 92 mM, pH 7,0, a una velocidad de flujo de 0,3 ml/minuto. Las condiciones operativas del sistema de HPLC fueron como se indica a continuación:

Fase móvil: Na₂SO₄ 211 mM, Na₂HPO₄*7H₂O 92 mM, pH 7,0

Gradiente: Isocrático

Velocidad de flujo: 0,3 ml/minuto

Longitud de onda del detector: 280 nm

Temperatura del enfriador del muestreador automático: 4°C

Temperatura del horno de la columna: Ambiente

Duración de la corrida: 50 minutos

La Tabla 11 contiene los datos de la pureza de las construcciones de anticuerpos expresados como un porcentaje de monómeros (proteína no agregada del peso molecular esperado) determinado con el protocolo anterior.

Tabla 11. Pureza de los anticuerpos anti-hTNF- α sobre la base de una cromatografía de exclusión por tamaño

ID del anticuerpo	VH	VL	% de monómeros (pureza)
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	97

AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	97
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	96
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	97
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	98
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	96
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	96
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	97
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	95
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	96
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	96
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	97
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	98
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	100
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	100
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	99
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	100
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	98
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	95
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	94
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	95
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	88
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	88
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	91
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	97
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	98
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	97
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	92
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	98
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	99
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	85
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	81

AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	83
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	87
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	83
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	84

Los anticuerpos anti-hTNF- α presentaron un perfil de SEC excelente: la mayoría de ellos presentaron más de 95% de monómeros.

SDS-PAGE

Se analizan los anticuerpos por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. Se usa el lote Adalimumab de AFP04C como un control. Para las condiciones reductoras, se mezclan las muestras 1:1 con la solución 2X amortiguadora de tris glicina para muestras de SDS-PAGE (Invitrogen, cat N° LC2676, lote N° 1323208) con DTT 100 mM, y se calientan a 60°C durante 30 minutos. Para las condiciones no reductoras, se mezclan las muestras 1:1 con la solución amortiguadora para muestras y se calientan a 100°C durante 5 minutos. Las muestras reducidas (10 mg por calle) se cargan en un gel de tris-glicina 12% pre-armado (Invitrogen, cat N° EC6005box, lote N° 6111021), y las muestras no reducidas (10 mg por calle) se cargan en un gel de tris-glicina 8%-16% pre- armado (Invitrogen, cat N° EC6045box, lote N° 6111021). Véase Blue Plus 2 (Invitrogen, cat N° LC5925, lote N° 1351542) se usa como un marcador de peso molecular. Se corren los geles en una caja-celda de mini gel XCell SureLock (Invitrogen, cat N° EI0001) y se separan las proteínas aplicando primero un voltaje de 75 para concentrar las muestras en el gel, seguido por un voltaje constante de 125 hasta que el frente de colorante alcanza la base del gel. La solución amortiguadora de corrida usada es la solución amortiguadora 1X tris glicina SDS, preparada a partir de una solución amortiguadora 10X tris glicina SDS (ABC, MPS-79-080106). Los geles se tiñen durante la noche con colorante azul coloidal (Invitrogen cat N° 46-7015, 46-7016) y se destiñen con agua Milli-Q hasta que el fondo se encuentra transparente. Luego se analizan los geles teñidos usando un analizador de Expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641).

Análisis de la velocidad de sedimentación

Se cargan los anticuerpos en la cámara de la muestra de cada una de tres piezas centrales estándar de dos-sectores de carbono epon. Estas piezas centrales tienen una longitud de paso óptico de 1,2 cm y están construidas con ventanas de zafiro. Se usa PBS como solución amortiguadora de referencia y cada cámara contuvo 140 µl. Se examinan todas las muestras simultáneamente usando un rotor de 4 cavidades (AN-60Ti) en una ultracentrífuga analítica Beckman ProteomeLab XL-I (Nº de serie PL106C01).

Se programan las condiciones de corrida y se realiza el control de la centrífuga usando ProteomeLab (v5.6). Se permite que las muestras y el rotor lleguen al equilibrio térmico durante una hora previa al análisis ($20,0 \pm 0,1$ °C). La confirmación del cargado correcto de las celdas se realiza a 3000 rpm y se registra un único análisis para cada celda. Las condiciones de la velocidad de sedimentación son las siguientes:

Volumen de la Celda de la Muestra: 0,035 ml

Volumen de la Celda de Referencia: 0,035 ml

Temperatura: 20°C

Velocidad del Rotor: 35000 rpm

Tiempo horas

Longitud de onda UV: 280 nm

Tamaño del Paso Radial: 0,003 cm

Recolección de datos. Un dato por paso sin promedio de señal.

Cantidad Total de Análisis: 100

Medición de peso molecular de los anticuerpos intactos por LC-MS

Se analizan los pesos moleculares de anticuerpos intactos por LC-MS. Cada anticuerpo se diluye hasta aproximadamente 1 mg/ml con agua. Se usa un sistema HPLC 1100 (Agilent) con una microtrampa para proteínas (Michrom Bioresources, Inc, cat Nº 004/25109/03) para desalar e introducir 5 mg de la muestra en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se usa un gradiente corto para eluir las muestras. Se corre el gradiente con la fase móvil A (0,08% FA, 0,02% TFA en agua de HPLC) y la fase móvil B (0,08% FA y 0,02% TFA en acetonitrilo) con una baja velocidad de flujo de 50

ml/minuto. El espectrómetro de masa se opera en un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts con un rango de análisis de proporción masa a carga entre 2000 y 3500.

Medición del peso molecular por LC-MS de cadenas livianas y pesadas de anticuerpos

Las medidas de peso molecular de la cadena liviana (LC), cadena pesada (HC) y HC desglicosilada de los anticuerpos se analizan por LC-MS. Un anticuerpo se diluye a 1 mg/ml con agua y la muestra se reduce a LC y HC con una concentración final de 10 mM DTT durante 30 minutos a 37°C. Para desglicosilar el anticuerpo, se incuban 100 mg del anticuerpo con 2 ml de PNGasa F, 5 ml de 10% N-octilglucósido en un volumen total de 100 ml durante la noche a 37 °C. Luego de la desglicosilación, la muestra se reduce con una concentración final de 10 mM DTT durante 30 minutos a 37°C. Se usa un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna C4 (Vydac, cat# 214TP5115, S/N 060206537204069) para desalar e introducir la muestra (5 mg) en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se usa un gradiente corto para eluir las muestras. Se corre el gradiente con la fase móvil A (0,08% FA, 0,02% TFA en agua de HPLC) y la fase móvil B (0,08% FA y 0,02% TFA en acetonitrilo) con una baja velocidad de flujo de 50 ml/minuto. El espectrómetro de masa se opera en un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts con un rango de análisis de proporción masa a carga entre 800 y 3500.

Mapeo de los péptidos

Se desnaturaliza el anticuerpo durante 15 minutos a temperatura ambiente con una concentración final de clorhidrato de guanidinio 6 M en 75 mM bicarbonato de amonio. Las muestras desnaturalizadas se reducen con una concentración final de DTT 10 mM a 37°C durante 60 minutos, seguido por alquilación con ácido iodoacético 50 mM (IAA) en oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Luego de la alquilación, la muestra se dializa durante la noche contra cuatro litros de bicarbonato de amonio 10 mM a 4°C. La muestra dializada se diluye a 1 mg/ml con bicarbonato de amonio 10 mM, pH 7,8 y se digieren 100 mg de anticuerpo con tripsina (Promega, cat# V5111) o Lys-C (Roche, cat# 11 047 825 001) a una relación de 1:20 (peso en peso) tripsina/Lys-C:anticuerpo a 37°C durante 4 horas. Los digeridos se detienen con 1 ml de HCl 1 N. Para el

mapeo de péptidos con detección por espectrómetro de masa, se separaron 40 ml de las digestiones por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RPHPLC) en una columna C18 (Vydac, cat# 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) con un sistema de HPLC Agilent 1100. Se corre la separación con el mismo gradiente usado para el mapeo de péptidos, usando la fase móvil A (0,02% TFA, 0,08% FA en agua de grado de HPLC) y la fase móvil B (0,02% TFA y 0,08% FA en acetonitrilo) con una velocidad de flujo de 50 ml/minuto. -{-El espectrómetro de masa API QSTAR Pulsar i se opera en modo positivo con un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts y un rango de análisis de proporción masa a carga entre 800 y 2500.

Mapeo de los puentes disulfuro

Para desnaturalizar el anticuerpo, se mezclan 100 ml de anticuerpo con 300 ml de HCl de guanidinio 8 M en bicarbonato de amonio 100 mM. Se chequea el pH para asegurar que se encuentre entre 7 y 8 y se desnaturalizan las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente en una concentración final de HCl de guanidinio 6 M. Una porción de la muestra desnaturalizada (100 ml) se diluye a 600 ml con agua Milli-Q para dar una concentración final de HCL de guanidinio de 1 M. La muestra (220 mg) se digiere con tripsina (Promega, cat # V5111, lote # 22265901) o Lys-C (Roche, cat# 11047825001, lote # 12808000) con unas relaciones 1:50 tripsina o 1:50 Lys-C: anticuerpo (peso en peso) (4,4 mg de enzima: 220 mg de muestra) a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Se agregaron 5 mg adicionales de tripsina o Lys-C a las muestras y la digestión se permitió proceder durante 2 horas adicionales a 37°C. Las digestiones se detuvieron por el agregado de 1 ml de TFA a cada muestra. Las muestras digeridas se separan por RPHPLC usando una columna C18 (Vydac, cat N° 218TP51 S/N NE020630-4-1A) en un sistema de HPLC Agilent. Se corre la separación con el mismo gradiente usado para el mapeo de péptidos, usando la fase móvil A (0,02% TFA, 0,08% FA en agua de grado de HPLC) y la fase móvil B (0,02% TFA y 0,08% FA en acetonitrilo) con una velocidad de flujo de 50 ml/minuto. Las condiciones operativas de HPLC son las mismas que las usadas para el mapeo de péptidos. El espectrómetro de masa API QSTAR Pulsar i se opera en modo positivo con un voltaje de aerosol

de 4,5 kvolts y un rango de análisis de proporción masa a carga entre 800 y 2500. Los enlaces disulfuro se asignan por comparación de los MWs observados de los péptidos con los MWs predichos de péptidos trípticos o Lys-C unidos por enlaces disulfuro.

Determinación de sulfhidrilos libres

El método usado para cuantificar cisteínas libres en un anticuerpo se basa en la reacción del reactivo de Ellman, 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), con grupos sulfhidrilo (SH) la cual da lugar a un producto cromofórico característico, ácido 5-tio-(2-nitrobenzóico) (TNB). La reacción se ilustra en la fórmula:



La absorbancia de TNB⁻ se mide a 412 nm usando un espectrofotómetro Cary 50. Se grafica una curva de absorbancia usando diluciones de 2 mercaptoetanol (b-ME) como el estándar de SH libre y las concentraciones de los grupos sulfhidrilos libres en la proteína se determinan por absorbancia a 412 nm de la muestra.

Las soluciones madre de estándar b-ME se prepara por dilución seriada de 14,2 M b-ME con agua de grado HPLC hasta una concentración final de 0,142 mM. Luego se prepararon los estándares por triplicado para cada concentración. Se concentra el anticuerpo hasta 10 mg/ml usando un filtro de ultra centrifuga Amicon 10000 MWCO (Millipore, cat N° UFC801096, lote N° L3KN5251) y la solución amortiguadora se cambia a la formulación de solución amortiguadora usada para Adalimumab (fosfato de sodio monobásico 5,57 mM, fosfato de sodio dibásico 8,69 mM, NaCl 106,69 mM, citrato de sodio 1,07 mM, ácido cítrico 6,45 mM, manitol 66,68 mM, pH 5,2, Tween® 0,1% (p/v)). Se mezclan las muestras en un agitador a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se agregaron 180 µl de 100 mM de solución amortiguada con Tris, pH 8,1 a cada muestra y estándar seguido por el agregado de 300 µl de 2 mM DTNB en 10 mM de solución amortiguada con fosfato, pH 8,1. Luego de un riguroso mezclado, se mide la absorción a 412 nm de las muestras y estándares en un espectrofotómetro Cary 50. La curva estándar se obtiene por el gráfico de la cantidad de SH libre y OD₄₁₂ nm de los estándares de b-ME. Se

calcula el contenido de SH libres de las muestras en base a esta curva después de la sustracción del blanco.

Cromatografía de intercambio catiónico débil

El anticuerpo se diluye a 1 mg/ml con fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0. La heterogeneidad de carga se analiza usando un sistema de HPLC Shimadzu HPLC con una columna analítica WCX-10 ProPac (Dionex, cat# 054993, S/N 02722). Las muestras se cargan en la columna en 80% de la fase móvil A (fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0) y 20% de la fase móvil B (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 500 mM, pH 6,0) y se eluyen con una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto.

Caracterización de oligosacáridos

Se derivatizan los oligosacáridos liberados después del tratamiento del anticuerpo con PNGasa F, con el reactivo de marcado 2-aminobenzamida (2-AB). Se separan los oligosacáridos marcados con fluorescencia por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal (NPHPLC) y se caracterizan las diferentes formas de oligosacáridos en base a la comparación del tiempo de retención con estándares conocidos.

El anticuerpo se digiere primero con PNGasa F para cortar los oligosacáridos N-unidos de la porción Fc de la cadena pesada. Se coloca el anticuerpo (200 mg) en un tubo Eppendorf de 500 ml junto con 2 ml de PNGasa F y 3 ml de N-octilglucósido 10%. Se agrega una solución amortiguadora salina de fosfatos para llevar el volumen final a 60 ml. Se incuba la muestra durante la noche a 37°C en un termoagitador Eppendorf ajustado en 700 RPM. También se digiere el lote AFP04C de Adalimumab con PNGasa F como un control.

Después del tratamiento con PNGasa F, se incuban las muestras a 95°C durante 5 minutos en un termoagitador Eppendorf ajustado en 750 RPM para precipitar las proteínas, luego se colocan las muestras en una centrifuga Eppendorf durante 2 minutos a 10000 RPM para bajar las proteínas precipitadas. Los sobrenadantes que contienen los oligosacáridos se transfieren a un tubo Eppendorf de 500 ml y se secan en una Speed-vac a 65°C.

Se marcan los oligosacáridos con 2AB usando un 2AB conjunto de elementos de marcado adquirido de Prozyme (cat N° GKK-404, lote N° 132026). El reactivo de marcado se prepara de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se agrega ácido acético (150 ml, provisto en el conjunto de elementos) al vial de DMSO (provisto en el conjunto de elementos) y se mezcla por pipeteo de la solución hacia arriba y hacia abajo varias veces. Se transfiere la mezcla de ácido acético/DMSO (100 ml) a un vial del colorante 2-AB (justo antes de su uso) y se mezcla hasta que el colorante se encuentra completamente disuelto. Luego se agrega la solución del colorante a un vial de reductor (provisto en el conjunto de elementos) y se mezcla bien (reactivo de marcado). El reactivo de marcado (5 ml) se agrega a cada vial de la muestra seca de oligosacáridos, y se mezclan exhaustivamente. Se colocan los viales de la reacción en un termoagitador Eppendorf ajustado a 65°C y 700-800 RPM durante 2 horas de reacción.

Después de la reacción de marcado, se remueve el exceso de colorante fluorescente usando Cartuchos GlicoClean S de Prozyme (cat N° GKI-4726). Los cartuchos se lavan antes de la adición de las muestras con 1 ml de agua Milli-Q seguido por 5 lavados de 1 ml de solución de ácido acético 30%. Justo antes de agregar las muestras, se agrega 1 ml de acetonitrilo (Burdick y Jackson, cat N° AH015-4) a los cartuchos.

Después de que todo el acetonitrilo hubo pasado a través del cartucho, la muestra se ubica sobre el centro del disco recientemente lavado y se permite su adsorción al disco durante 10 minutos. Se lava el disco con 1 ml de acetonitrilo seguido por cinco lavados de 1 ml de acetonitrilo 96%. Los cartuchos se colocan encima de un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eluyen los oligosacáridos marcados con 2-AB con 3 lavados (400 ml cada lavado) de agua Milli Q.

Se separan los oligosacáridos usando una columna de HPLC Glicosep N (cat N° GKI-4728) conectada a un sistema de HPLC Shimadzu. El sistema de HPLC Shimadzu consistió de un controlador del sistema, un degaseador, bombas binarias, un cargador automático de muestras con un enfriador de muestra, y un detector de fluorescencia.

Estabilidad a temperaturas elevadas

Se ajusta la concentración final de los anticuerpos a 2 mg/ml con las soluciones amortiguadoras apropiadas, así como tensioactivos, estabilizantes y/o azúcares. Luego se esterilizan por filtración las soluciones de anticuerpo y se preparan alícuotas de 0,25 ml bajo condiciones de esterilidad. Las alícuotas se dejan ya sea a -80°C, 5°C, 25°C, o 40°C durante 1, 2 o 3 semanas. Al final del período de incubación, se analizan las muestras por cromatografía de exclusión de tamaño y SDS-PAGE.

Las muestras de estabilidad se analizan por SDS-PAGE tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. El procedimiento usado es el mismo que se describe en la presente solicitud. Los geles se tiñen durante la noche con colorante azul coloidal (Invitrogen cat N° 46-7015, 46-7016) y se destiñen con agua Milli-Q hasta que el fondo se encuentra transparente. Luego se analizan los geles teñidos usando un analizador de Expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641). Para obtener más sensibilidad, se tiñen los mismos geles con plata usando el conjunto de elementos para tinción con plata (Owl Scientific) y se usan los procedimientos recomendados dados por el proveedor.

Ejemplo 2.9. Transfección y expresión en células HEK 293-6E

Las construcciones con los vectores para los anticuerpos anti-hTNF- α se tranfectaron en células 293 para producir las proteínas. El procedimiento de transfección transitoria utilizado es una modificación de los métodos publicados en Durocher et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30(2):E9 y Pham et al. (2005) *Biotech. Bioengineering* 90(3):332-44. Los reactivos que se usaron en la transfección incluyen:

- Células HEK 293-6E (línea celular embrionaria humana de riñón que expresa EBNA1 en forma estable; obtenida del National Research Council Canada) cultivadas en botellas de Erlenmeyer descartables en un incubador humidificado regulado a 130 rpm, 37°C y 5% CO₂.
- Medio de cultivo: Medio de Expresión FreeStyle 293 (Invitrogen 12338-018) más 25 µg/ml Geneticina (G418) (Invitrogen 10131-027) y 0,1% Pluronic

F-68 (Invitrogen 24040-032).

- Medio de transfección: Medio de expresión FreeStyle 293 más 10 mM HEPES (Invitrogen 15630-080).
- Solución madre de polietilenimina (PEI): Polietilenimina (PEI) solución madre: 1 mg/ml estéril, pH 7,0, preparada con PEI linear de 25kDa (Polysciences) y almacenada a menos de -15°C.
- Medio alimenticio de triptona: 5% p/v de la solución madre estéril de Triptona N1 (Organotechnie, 19554) en Medio de Expresión FreeStyle 293.

Preparación de las células para transfección: Aproximadamente entre 2 y 4 horas antes de la transfección, se cosecharon las células HEK 293-6E por centrifugación y se resuspendieron en medio de cultivo a una densidad celular de aproximadamente 1 millón de células viables por ml. Para cada transfección, se transfirieron 40 ml de la suspensión de células a una botella de Erlenmeyer descartable de 250-ml y se incubaron durante 2 - 4 horas.

Transfección: El medio de transfección y la solución madre de PEI fueron precalentados a temperatura ambiente (TA). Para cada transfección, se combinaron 25µg de ADN plasmídico y 50µg de polietilenimina (PEI) en 5 ml de medio de transfección y se incubaron durante 15 – 20 minutos a TA para permitir la formación de los complejos ADN:PEI. Para las transfecciones BR3-Ig, se utilizaron 25µg del plásmido BR3-Ig por transfección. Se agregó cada una de las mezclas de 5-ml del complejo DNA:PEI a los 40-ml de cultivo preparados anteriormente y se los devolvió al incubador humidificado regulado a 130 rpm, 37°C y 5% CO₂. Después de entre 20 y 28 horas, se agregaron 5 ml del Medio Alimenticio de Triptona a cada transfección y los cultivos se mantuvieron durante seis días.

En la tabla 12 se proveen los datos del rendimiento de los anticuerpos progenitores en las células HEK 293-6E, expresados en miligramos por litro.

Tabla 12. Rendimiento de la expresión transitoria de los anticuerpos anti-hTNF- α en células HEK 293-6E

ID del anticuerpo	VH	VL	Rendimiento de la expresión (mg/l)
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	67
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	56
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	87
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	81
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	54
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	22
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	78
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	63
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	92
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	92
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	52
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	30
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	27
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	2
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	4
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	4
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	3
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	3
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	28
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	20
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	31
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	107
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	73
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	59
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	105

AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	83
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	106
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	120
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	75
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	10
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	48
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	55
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	70
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	74
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	75
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	42

Todos los anticuerpos se expresaron apropiadamente en las células HEK 293-6E. En la mayoría de los casos, fue posible obtener fácilmente más de 50 mg/l de cada anticuerpo purificado de los sobrenadantes de las células HEK 293-6E.

En la presente invención se incorporan por completo a modo de referencia las técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular. Estas técnicas incluyen, sin limitaciones, las técnicas que se describen en las siguientes publicaciones:

Ausubel et al. editores, Short Protocols In Molecular Biology (4^a edición 1999) John Wiley & Sons, NY (ISBN 0-471-32938-X).

Lu y Weiner editores, Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press, Westborough, MA, 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

Kontermann y Dübel, editores, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, NY, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Old y Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3^a edición, 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), volúmenes 1-3

(ISBN 0-87969-309-6).

Winnacker, From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (traducido por Horst Ibelgaufits), 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

INCORPORACIÓN A MODO DE REFERENCIA

Los contenidos de todas las referencias (incluyendo las referencias de la literatura, las patentes, las solicitudes de patentes y los sitios de Internet) que se citan en esta solicitud se incorporan expresamente a modo de referencia, en su totalidad y para cualquier propósito, al igual que las referencias que se citan en ellas. A menos que se indique lo contrario, para poner en práctica las formas de realización que se describen en la presente se emplearán procedimientos convencionales de inmunología, de biología molecular y de biología celular que han de ser conocidos en la técnica.

EQUIVALENTES

Las formas de realización pueden llevarse a cabo de otras maneras específicas sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la invención. Por lo tanto, ha de comprenderse que las formas de realización que se describieron con anterioridad se proporcionaron con fines ilustrativos, y no para limitar el alcance de la invención, que solamente está delimitado por las reivindicaciones adjuntas. Todos los cambios dentro del significado y el rango de equivalencia de las reivindicaciones han de quedar dentro del alcance de la presente.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, CARACTERIZADO PORQUE comprende SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39; SEQ ID N° 40; SEQ ID N° 41; SEQ ID N° 42; SEQ ID N° 43; SEQ ID N° 44; SEQ ID N° 45 o SEQ ID N° 46.
2. Un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de éste, CARACTERIZADO PORQUE puede unirse al TNF- α y porque comprende al menos una CDR que comprende los residuos 31-35 de SEQ ID N° 31 (CDR-H1), los residuos 50-66 de SEQ ID N° 31 (CDR-H2), los residuos 99-113 de SEQ ID N° 31 (CDR-H3), los residuos 24-34 de SEQ ID N° 32 (CDR-L1), los residuos 50-56 de SEQ ID N° 32 (CDR-L2) o los residuos 89-97 de SEQ ID N° 32 (CDR-L3).
3. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión comprende al menos tres CDR.
4. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE las al menos tres CDR comprenden un dominio variable con un conjunto de CDR que abarca
 - (a) los residuos 31-35 de SEQ ID N° 31 (CDR-H1), los residuos 50-66 de SEQ ID N° 31 (CDR-H2) y los residuos 99-113 de SEQ ID N° 31 (CDR-H3); o
 - (b) los residuos 24-34 de SEQ ID N° 32 (CDR-L1), los residuos 50-56 de SEQ ID N° 32 (CDR-L2) y los residuos 89-97 de SEQ ID N° 32 (CDR-L3).
5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE comprende al menos dos conjuntos de CDR del dominio variable.
6. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión comprende
 - (a) los residuos 31-35 de SEQ ID N° 31 (CDR-H1), los residuos 50-66 de SEQ ID N° 31 (CDR-H2) y los residuos 99-113 de SEQ ID N° 31 (CDR-H3); y
 - (b) los residuos 24-34 de SEQ ID N° 32 (CDR-L1), los residuos 50-56 de SEQ ID N° 32 (CDR-L2) y los residuos 89-97 de SEQ ID N° 32 (CDR-L3).

7. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE además comprende un marco de trabajo aceptor humano.
8. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADA PORQUE el marco de trabajo aceptor humano comprende cualquiera de SEQ ID N° 10-19 o SEQ ID N° 20-30.
9. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, CARACTERIZADA PORQUE dicho marco de trabajo aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región del marco de trabajo, donde la secuencia de aminoácidos del marco de trabajo es al menos un 65% idéntica a la secuencia del marco de trabajo aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos al marco de trabajo aceptor humano.
10. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE el marco de trabajo aceptor humano comprende al menos una sustitución de un aminoácido en un residuo de la región del marco de trabajo que se encuentra en una posición adyacente a una CDR, en un residuo de un sitio de glucosilación, en un residuo que puede interactuar con el TNF- α humano, en un residuo que puede interactuar con una CDR, en un residuo canónico, en un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana, en un residuo en la zona de Vernier o en un residuo en una región que está superpuesta con la CDR1 de la región variable, de acuerdo con la definición de Chotia, y el marco de trabajo de la primera pesada, de acuerdo con la definición de Kabat.
11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA PORQUE el residuo es 1H, 2H, 67H, 69H, 71H, 82H, 85H, 91H, 2L, 43L, 44L, 49L, 71L o 87L.
12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión comprende un aceptor humano consenso
13. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende

(a) un polipéptido de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 42, y

(b) un polipéptido de la región variable de la cadena liviana que comprende SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45 y SEQ ID N° 46.

14. La proteína de unión de la reivindicación 13, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende un polipéptido de la región variable de la cadena pesada y un polipéptido de la región variable de la cadena liviana que comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos, respectivamente:

SEQ ID N° 31 y SEQ ID N° 32;

SEQ ID N° 33 y SEQ ID N° 35;

SEQ ID N° 33 y SEQ ID N° 43;

SEQ ID N° 33 y SEQ ID N° 44;

SEQ ID N° 33 y SEQ ID N° 36;

SEQ ID N° 33 y SEQ ID N° 45;

SEQ ID N° 33 y SEQ ID N° 46;

SEQ ID N° 34 y SEQ ID N° 35;

SEQ ID N° 34 y SEQ ID N° 43;

SEQ ID N° 34 y SEQ ID N° 44;

SEQ ID N° 34 y SEQ ID N° 36;

SEQ ID N° 34 y SEQ ID N° 45;

SEQ ID N° 34 y SEQ ID N° 46;

SEQ ID N° 37 y SEQ ID N° 35;

SEQ ID N° 37 y SEQ ID N° 43;

SEQ ID N° 37 y SEQ ID N° 44;

SEQ ID N° 37 y SEQ ID N° 36;

SEQ ID N° 37 y SEQ ID N° 45;

SEQ ID N° 37 y SEQ ID N° 46;

SEQ ID N° 38 y SEQ ID N° 35,
SEQ ID N° 38 y SEQ ID N° 43;
SEQ ID N° 38 y SEQ ID N° 44;
SEQ ID N° 38 y SEQ ID N° 36;
SEQ ID N° 38 y SEQ ID N° 45;
SEQ ID N° 38 y SEQ ID N° 46;

SEQ ID N° 39 y SEQ ID N° 35,
SEQ ID N° 39 y SEQ ID N° 43;
SEQ ID N° 39 y SEQ ID N° 44;
SEQ ID N° 39 y SEQ ID N° 36;
SEQ ID N° 39 y SEQ ID N° 45;
SEQ ID N° 39 y SEQ ID N° 46;

SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 35,
SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 43;
SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 44;
SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 36;
SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 45;
SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 46;

SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 35;
SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 43;
SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 44;
SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 36;
SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 45;
SEQ ID N° 41 y SEQ ID N° 46;
SEQ ID N° 42 y SEQ ID N° 35,
SEQ ID N° 42 y SEQ ID N° 43;
SEQ ID N° 42 y SEQ ID N° 44;

SEQ ID N° 42 y SEQ ID N° 36;

SEQ ID N° 42 y SEQ ID N° 45; o

SEQ ID N° 42 y SEQ ID N° 46.

15. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión es una molécula de inmunoglobulina, un fragmento Fv con puentes disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un fragmento scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con un solo dominio, un anticuerpo con una CDR injertada, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un fragmento Fab, un anticuerpo con especificidad doble, una proteína DVD-Ig, un fragmento Fab', un anticuerpo biespecífico, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv.

16. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende un dominio constante de la IgM humana, un dominio constante de la IgG4 humana, un dominio constante de la IgG1 humana, un dominio constante de la IgE humana, un dominio constante de la IgG2 humana, un dominio constante de la IgG3 humana o un dominio constante de la IgA humana.

17. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE también comprende una región constante de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3.

18. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE también comprende una región constante de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5.

19. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene la capacidad de neutralizar el TNF- α humana.

20. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de asociación (K_{on}) con dicho blanco s de al menos aproximadamente $10^2 M^{-1} s^{-1}$ aproximadamente; al menos $10^3 M^{-1} s^{-1}$ aproximadamente; al menos $10^4 M^{-1} s^{-1}$ aproximadamente; al menos $10^5 M^{-1} s^{-1}$ aproximadamente; o al menos $10^6 M^{-1} s^{-1}$ aproximadamente, medida por resonancia de plasmón superficial.

21. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE

dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_{off}) se dicho blanco de: a lo sumo 10^{-3}s^{-1} aproximadamente; a lo sumo 10^{-4}s^{-1} aproximadamente; a lo sumo 10^{-5}s^{-1} aproximadamente; o a lo sumo $10,6\text{s}^{-1}$ aproximadamente, medida por resonancia de plasmón superficial.

22. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) de dicho blanco de: a lo sumo 10^{-7} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-8} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-9} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-10} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-11} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-12} M aproximadamente; o a lo sumo 10^{-13} M.

23. La proteína de unión de la reivindicación 22, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) del TNF- α de: a lo sumo 10^{-7} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-8} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-9} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-10} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-11} M aproximadamente; a lo sumo 10^{-12} M aproximadamente; y a lo sumo 10^{-13} M.

24. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión también comprende una molécula de inmunoadhesión, un agente para realizar un diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico o un agente citotóxico.

25. La proteína de unión de la reivindicación 24, CARACTERIZADA PORQUE dicho agente para realizar un diagnóstico por imágenes es una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética o la biotina.

26. La proteína de unión de la reivindicación 25, CARACTERIZADA PORQUE dicha radiomarca es ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm .

27. La proteína de unión de la reivindicación 24, CARACTERIZADA PORQUE dicho agente terapéutico o citotóxico es un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

28. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión presenta un patrón de glicosilación humano.
29. La proteína de unión de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión es una proteína de unión cristalizada.
30. Un ácido nucleico aislado, CARACTERIZADO PORQUE codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión de la reivindicación 1.
31. Un vector, CARACTERIZADO PORQUE comprende un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión de la reivindicación 1.
32. El vector de la reivindicación 31, CARACTERIZADO PORQUE dicho vector es pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE o pBJ.
32. Una célula huésped, CARACTERIZADA PORQUE comprende al vector de la reivindicación 31.
33. La célula huésped de la reivindicación 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula procariota.
34. La célula huésped de 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula eucariota.
35. La célula huésped de la reivindicación 34, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula eucariota es una célula de un protista, una célula de un animal, una célula de una planta, una célula de un hongo, una célula de un mamífero, una célula de un ave o una célula de un insecto.
36. La célula huésped de la reivindicación 35, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula eucariota es *S. cerevisiae*, una célula CHO, una célula COS o una célula SF9.
37. Un método para producir una proteína capaz de unirse al TNF- α , CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende los pasos de cultivar la célula huésped descrita de la reivindicación 32 en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse al TNF- α .
38. Una proteína, CARACTERIZADA PORQUE fue producida de acuerdo con el método de la reivindicación 37.
39. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende

una proteína de unión de la reivindicación 1 o de la reivindicación 37 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40. La composición farmacéutica de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE además comprende al menos un agente adicional para el tratamiento de un trastorno en el cual la actividad de el TNF- α es perjudicial.

41. La composición farmacéutica de la reivindicación 40, CARACTERIZADA PORQUE dicho agente adicional es: un agente terapéutico, un agente para obtener imágenes, un agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de quinasas; bloqueantes de moléculas de co-estimulación; bloqueantes de moléculas de adhesión; anticuerpos anti-citoquina o un fragmento funcional de éste; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; una marca o informante detectable; un antagonista del TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, una droga de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un esteroide oral, una epinefrina o un análogo de ésta, una citoquina o un antagonista de citoquina.

42. Un método de tratamiento de un mamífero, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de la composición de la reivindicación 39.

43. Un método para reducir la actividad de el TNF- α humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende poner dicha TNF- α humana en contacto con la proteína de unión de la reivindicación 1 de modo tal que se reduce la actividad de el TNF- α humana.

44. Un método para reducir la actividad de el TNF- α humana en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad TNF- α es perjudicial, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrarle al sujeto humano la

proteína de unión de la reivindicación 1, de modo tal que se reduce la actividad de el TNF- α humana en el sujeto humano.

45. Un método de tratamiento de un sujeto por una enfermedad o un trastorno en el cual la actividad de el TNF- α es perjudicial, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración al sujeto de la proteína de unión de la reivindicación 1 de modo tal que se logra dicho tratamiento.

46. El método de la reivindicación 45, CARACTERIZADO PORQUE el trastorno es un trastorno autoinmune y/o inflamatorio.

46. El método de la reivindicación 46, CARACTERIZADO PORQUE el trastorno es la enfermedad de Crohn, la psoriasis con placas, la artritis reumática, la artritis psoriática, la osteoartritis, la artritis idiopática juvenil, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, la espondilitis anquilosante, la diabetes mellitus insulín dependiente, la diabetes autoinmune, la alergia o la uveítis autoinmune.

47. El método de la reivindicación 46, CARACTERIZADO PORQUE el trastorno es un trastorno respiratorio, tal como el asma, que puede ser alérgico o no alérgico y que puede deberse a una infección, tal como una infección del virus sincicial respiratorio (RSV), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), una afección relacionada con una inflamación en las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis, la producción excesiva de moco, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar, los trastorno atópicos, la dermatitis atópica, la urticaria, el eccema, la rinitis alérgica, la enterogastritis alérgica, una afección inflamatoria y/o autoinmune de la piel, una afección inflamatoria y/o autoinmune de los órganos gastrointestinales, una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la colitis ulcerosa, una afección inflamatoria y/o autoinmune del hígado, la cirrosis hepática, la fibrosis hepática, la fibrosis hepática provocada por virus de la hepatitis B y/o C, el escleroderma, un tumores o un cáncer, un carcinoma hepatocelular, un glioblastoma, un linfoma, un linfoma de Hodgkin, una infección provocada por un virus, por una bacteria o por un parásito, una infección del HTLV-1, la supresión de la manifestación de las respuestas inmunes de protección del tipo 1 o la supresión de la manifestación de las respuestas inmunes de protección del tipo 1 durante la vacunación.

48. Un método para tratar un paciente que padece un trastorno en el que el TNF- α resulta perjudicial, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar una proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1 antes de un segundo agente, de manera concurrente con él o después de él, donde dicho segundo agente es un anticuerpo, o un fragmento de éste, que puede unirse a la IL-12 humana, PGE2, LPA, el NGF, CGRP, SubP, RAGE, histamina, un bloqueador de los receptores de histamina, bradiquinina, IL-1 α , IL-1 β , el VEGF, el PLGF, metotrexato, un corticosteroide, un modulador de los receptores de glucocorticoides, ciclosporina, rapamicina, FK506 o un agente antiinflamatorio no esteroidal.

49. Un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno en el cual el TNF- α es perjudicial, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende el paso de administrar la proteína de unión de la reivindicación 1 antes, concurrentemente o después de la administración de un segundo agente, donde dicho segundo agente se selecciona entre antagonistas del TNF; un fragmento soluble de un receptor del TNF; ENBREL®; antagonistas de enzimas del TNF; inhibidores de la enzima convertidora del TNF; antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF- β ; gamma interferón; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, metotrexato; leflunomida; sirolimus (rapamicina) o un análogo de ésta, CCI-779; inhibidores de COX2 o cPLA2; NSAID; inmunomoduladores; inhibidores de p38; inhibidores de TPL-2, MK-2 y NF κ B; budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos anti-IL-1 β ; anticuerpos anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos o agonistas del TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF, o PDGF; anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos; FK506; rapamicina; micofenolato

mofetilo; ibuprofeno; prednisolona; inhibidores de fosfodiesterasa; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores del complemento; agentes adrenérgicos; inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasas; inhibidores de la enzima convertidora de IL-1b; inhibidores de la enzima convertidora del TNF α ; inhibidores de la señalización de linfocitos T; inhibidores de metaloproteinasas; 6-mercaptopurinas; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; receptores de citoquina soluble; receptor TNF p55 soluble; receptor del TNF p75 soluble; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; citoquinas anti-inflamatorias; y TGFb.

50. El método de acuerdo con las reivindicaciones 40-48, CARACTERIZADO PORQUE dicha administración al sujeto comprende al menos un modo entre parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

51. Un método para detectar el TNF- α humana en una muestra, CARACTERIZADO PORQUE comprende

(i) poner la muestra en contacto con una proteína de unión al TNF- α descrita en la reivindicación 1 o una porción de unión al TNF- α de ésta;

y

(ii) detectar la formación de un complejo entre la proteína de unión al TNF- α , o una porción de unión de ésta, y el TNF- α en la muestra, donde un cambio de significación estadística en la formación del complejo en la muestra, en comparación con lo que puede determinarse en una muestra control, es indicativo de la presencia del TNF- α en la muestra.

52. El método de acuerdo con la reivindicación 51, CARACTERIZADO PORQUE la muestra es de sangre completa, plasma, suero, orina, saliva o

biopsias de tejido.

53. Un método para detectar TNF- α humana en un sujeto humano, CARACTERIZADO PORQUE comprende

(i) administrar una proteína de unión al TNF- α descrita en la reivindicación 1, o un TNF- α porción de unión de ésta, a un sujeto de prueba o a un sujeto control bajo condiciones que permitan la unión de la proteína de unión al TNF- α , o de una porción de unión al TNF- α de ésta, al TNF- α humana;

y

(ii) detectar la formación de un complejo entre la proteína de unión o porción de unión de ésta y el TNF- α , donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto de prueba con relación al sujeto control o con relación a la formación del complejo en el sujeto de prueba en un momento anterior es indicativo de la presencia del TNF- α .

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 0080/13 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 24 de Junio de 2013 por el Sr. Gabriel Ricaurte Echeverri, C.C. 25.965 de Bogotá, Traductor Oficial según Resolución No. 3987 de agosto 17 de 1981 expedida por el Ministerio de Justicia.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
SUB-SECRETARIO DE COMERCIO DE PROPIEDAD INTELECTUAL
DIRECTOR DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS

Sello con el siguiente texto:

PTAS- 9 de oct 2012- Rotulado-

Yankwich & Asociados

501815128

FEBRERO 10 DE 2012

DIANA M. STEEL

100 RESEARCH DRIVE

WORCESTER, MA 01605



Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

AVISO DE INSCRIPCIÓN DE DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO SE HA INSCRITO POR LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA COMPLETA SE ENCUENTRA DISPONIBLE EN LA SALA DE BÚSQUEDA DE TRASPASOS EN EL NÚMERO DE MARCO Y CARRETE QUE SE RELACIONAN ABAJO.

FAVOR REVISAR TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE INSCRIPCIÓN REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED LLEGA A ENCONTRAR ALGÚN ERROR O TIENE PREGUNTAS ACERCA DE ESTE AVISO, USTED PUEDE CONTACTAR A LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS EN 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS, PARADA DE CORREO: RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS, A.A. 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 02/09/2012

MARCO/CARRETE: 027678/0802

NÚMERO DE PÁGINAS: 3

MEMORIAL: TRASPASO DEL INTERÉS DE LOS CEDENTES (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).

NÚMERO DE EXPEDIENTE: 10795USO1

CEDENTE:

ABBOTT GMBH & CO. KG

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/23/2012

CESIONARIO:

ABBOTT LABORATORIES

100 ABBOTT PARK ROAD

ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064


Gabriel Riquarte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

NÚMERO DE SOLICITUD: 13314878

FECHA DE RADICACIÓN:

NÚMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TÍTULO: PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A

RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS

DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

TRASPASO

Yo/Nosotros,

(1) Abbott GmbH & Co. KG

Que tiene una oficina y lugar de negocios en:

(1) Max-Planck Ring 2, 65205 Wiesbaden (DE)

A título oneroso, recibo del cual se reconoce por medio de este documento, han cedido, vendido y transferido y por medio de este documento ceden, venden y transfieren a Abbott Laboratories, una compañía organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois y que tiene una oficina y lugar de negocios en 100 Abbott Park Road, IL 60064, sus sucesores y cesionarios:

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

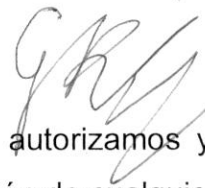
1) La totalidad del derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países a lo largo del mundo en y para todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos divulgados en la solicitud de los Estados Unidos Ser. N ° 13/314, 878, presentada el 08 de diciembre 2011 (Atty. Expediente No. 10795US01) y la Solicitud Internacional Serial N° PCT/US2011/063955, presentada el 08 de diciembre 2011 (Expediente No. Atty. 10795WOO1) y la designación de AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH y LI, IC, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HN, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MI, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW, tituladas: "PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A", incluyendo todas las renovaciones,

restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o re-evaluaciones, prórrogas, continuaciones y divisiones de las mismas, y cualquiera de las solicitudes que las substituyan;

2) La totalidad y el derecho completo para presentar las solicitudes de patentes a nombre de Abbott Laboratories, su representante, o a mí nombre a elección de Abbott Laboratories, o su representante, en las invenciones antes indicadas, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo;

3) La totalidad del derecho, título e interés en y sobre cualquier Patente de Invención que se pueda expedir sobre la misma en los Estados Unidos en cualquier otro país del mundo y cualquiera de las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nueva evaluaciones o re-evaluaciones prórrogas, de la misma, y

4) La totalidad del derecho, título e interés en toda Convención y los Derechos de los Tratados de todo tipo, incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y sobre las anteriores invenciones, descubrimientos y solicitudes.



Gabriel Ricarte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Nosotros por medio de este documento autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes la concesión y expedición de cualquiera y todas aquellas Patentes de Invención en los Estados Unidos y a lo largo del mundo a favor de Abbott Laboratories como cesionario de la totalidad del derecho, título, e interés en la misma, tan plena y completamente como si la misma hubiere sido tenida y disfrutada por nosotros si no hubiéramos efectuado esta cesión, venta y transferencia.

Nosotros también estamos de acuerdo, en cualquier momento, a solicitud de Abbott Laboratories, para firmar y entregar a Abbott Laboratories todas las solicitudes adicionales para las mencionadas patentes de invención y descubrimientos, o cualquier parte o partes de los mismos, y cualquiera de las

solicitudes para la confirmación, registro e importación de las patentes, con base en cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o reevaluaciones y prórrogas de las mismas.

Página 1 de 2

También estamos de acuerdo en cualquier momento para firmar y entregar a solicitud de Abbott Laboratories tales documentos adicionales, si los hubiere, pues son necesarios o convenientes para asegurar la protección de patentes sobre las mencionadas invenciones, descubrimientos y solicitudes a lo largo de todos los países del mundo, y de otra manera hacer lo necesario para darle plenos efectos y para perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories de conformidad con este Traspaso, incluyendo la firma, entrega y la adquisición de cualquiera y todos los demás documentos adicionales que prueben este traspaso, transferencia y venta como puede ser necesario o conveniente.

CEDENTE:

(Firmado)

Firma



Gabriel Ricardo Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Nombre: ppa. Dr. Stephan Bensiék

Título: Funcionario Senior Autorizado

Compañía: Abbott GmbH & Co.KG

(Firmado)

Firma

Nombre: ppa. Dr. Jürgen Bachmann

Título: Funcionario Senior Autorizado

Compañía: Abbott GmbH & Co.KG

RECONOCIMIENTO:

En este día 23 de enero de 2012, el Dr. Stephan Bensiék y el Dr. Jürgen Bachmann

Nombre (s)

Funcionarios Senior Autorizados, de Abbott GmbH & Co. KG, y autorizados para

Títulos (s)

firmar en representación de Abbott GmbH & Co.KG, comparecieron personalmente ante mí, firmaron el anterior Traspaso, y me reconocieron debidamente que tal Traspaso fue firmado como un acto y documento de la voluntad libre de él/ella para los fines y propósitos allí expresados.

(Firmado)

Firma del Testigo

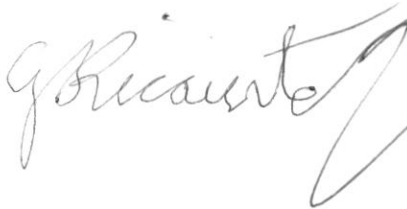
Nadine Paersch

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

Página 2 de 2

===

Es traducción fiel y completa de un documento escrito en inglés del cual queda copia en esta oficina y a la cual me remito para su confrontación.

 **Gabriel Ricaurte Echeverri**
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1984

ABT-125.0 US



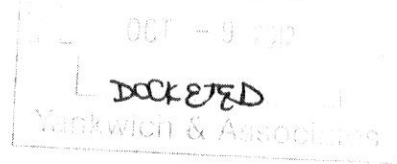
UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

FEBRUARY 10, 2012

DIANA M. STEEL
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605

PTAS



501815128

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

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

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 02/09/2012

REEL/FRAME: 027678/0802
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 10795US01

ASSIGNOR:
ABBOTT GMBH & CO. KG

DOC DATE: 01/23/2012

ASSIGNEE:
ABBOTT LABORATORIES
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064

APPLICATION NUMBER: 13314878
PATENT NUMBER:
TITLE: TNF-ALPHA BINDING PROTEINS

FILING DATE:
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

I/We,

(1) Abbott GmbH & Co. KG

having an office and place of business at:

(1) Max-Planck Ring 2, 65205 Wiesbaden (DE)

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois and having an office and a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 13/314,878, filed 08 December 2011 {Atty. Docket No. 10795USO1 } and International Application Ser. No. PCT/US2011/063955, filed 8 December 2011 {Atty. Docket No. 10795WOO1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GT, GW, HR, HN, HK, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MY, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; entitled: "TNF-Alpha BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott Laboratories, its designee, or in my name at the election of Abbott Laboratories or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

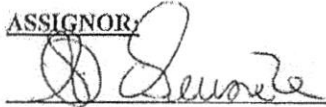
4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott Laboratories as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

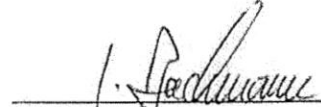
We further agree, at any time, upon the request of Abbott Laboratories, to execute and to deliver to Abbott Laboratories any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott Laboratories under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNOR:


Signature

Name: ppa. Dr. Stephan Bensiek
Title: Senior Authorised Officer
Company: Abbott GmbH & Co. KG

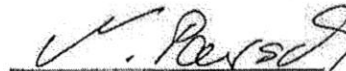

Signature

Name: ppa. Dr. Jürgen Bachmann
Title: Senior Authorised Officer
Company: Abbott GmbH & Co. KG

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 23rd day of January, 2012, Dr. Stephan Bensiek and Dr. Jürgen Bachmann,
Name(s)
Senior Authorised Officers, of Abbott GmbH & Co. KG, and
Title(s)

authorized to sign on behalf of Abbott GmbH & Co. KG, personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.


Witness signature

Nadine Paersch
Witness name (please print)

TRASPASO

Este Traspaso de Patente ("Traspaso") se hace y celebra este día 1 de agosto de 2012 por y entre Abbott Laboratories, una sociedad constituida y existente bajo las leyes de Illinois, con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois, 60064 Estados Unidos de América ("Abbott") y AbbVie Inc., una sociedad constituida y existente bajo las leyes de Delaware, con domicilio en 1 North Waukega Road, North Chicago, Illinois, 60064 ("AbbVie").

POR CUANTO, Abbott ha acordado traspasar y transferir a AbbVie y AbbVie ha acordado adquirir y aceptar de Abbott las solicitudes de patente y patentes indicadas en el Anexo de Patentes de Abbott A ("las Patentes de Abbott") adjunto al presente.

AHORA, POR LO TANTO, en contraprestación de las premisas, convenios mutuos y disposiciones contenidas en el presente, el recibo y suficiencia de lo cual se reconoce por el presente, y con la intención de que por el presente sea jurídicamente vinculante, las partes del presente acuerdan suscribir este Traspaso, así:

1.0 Traspaso. Abbott ha traspasado y/o por el presente traspasa, transfiere y cede a AbbVie, todo el derecho, título e interés de Abbott (i) en y de las invenciones reivindicadas en las Patentes de Abbott, incluyendo todas las patentes que se otorguen de dichas solicitudes sobre dichas Patentes de Abbott o cualquier continuación, continuación en parte, división, renovación, sustituto, reexamen o reemisión de la misma, incluyendo cualquier patente obtenida con base en una reivindicación de prioridad de cualquier patente o solicitud de patente sobre dichas Patentes de Abbott y (ii) en y de todos los derechos para demandar por y recaudar daños que resulten de infracciones pasadas, presentes y futuras de dichas patentes y solicitudes de patente en (i).

2.0 Disfrute. Las patentes y solicitudes de patente sujetas al Párrafo I serán tenidas y disfrutadas por AbbVie, para el uso y beneficio de AbbVie, y para los representantes legales y cesionarios de AbbVie, hasta el final del término o términos para el cual la misma se otorgue, tan completa y

enteramente como la misma hubiese sido tenida por Abbott si este traspaso y transferencia no se hubiese hecho.

3.0 Asistencia. Las partes de este Traspaso harán esfuerzos comercialmente razonables para tomar, o hacer que se tomen, todas las acciones, y para hacer, u ocasionar que se hagan, todas las cosas, necesarias o aconsejables para consumar las transacciones contempladas por este Traspaso. Sin limitación de lo anterior, Abbott y AbbVie cooperarán una con la otra sin consideración adicional para suscribir y entregar, o harán esfuerzos comercialmente razonables para ocasionar que se suscriban y entreguen, todos los documentos según sean razonablemente necesarios para asegurar el traspaso en AbbVie de todos los derechos traspasados a AbbVie por este Traspaso, incluyendo sin limitación todos los documentos requeridos para registrar este Traspaso ante las oficinas de patentes locales.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, cada una de las partes ha suscrito este Traspaso de Patente, o ha ocasionado que este Traspaso de Patente sea suscrito en su nombre por un representante debidamente autorizado, todo en la fecha escrita anteriormente.

Abbott Laboratories

Por: (firma: ilegible)

Nombre: Thomas Freyman

Cargo: Vicepresidente Ejecutivo, Gerente
Financiero

Estado de Illinois

Condado de Lake

Firmado y certificado ante mí el día 1 de agosto de 2012 por Amy B. Klein

Sello Oficial
Amy B. Klein
Notario Público – Estado de Illinois
Mi Nombramiento Expira: 01/15/13

Firma: (ilegible)

AbbVie Inc.

Por: (firma: ilegible)

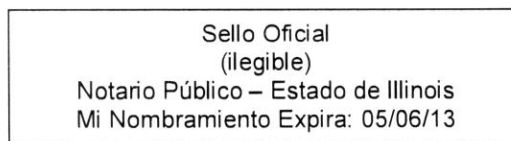
Nombre: William Chase

Cargo: Funcionario Autorizado de AbbVie Inc.

Estado de Illinois

Condado de Lake

Firmado y certificado ante mí el día 27 de julio de 2012 por William Chase



Firma: (ilegible)

Testigo

Nombre: Dina Shniderman

Firma: (ilegible)

Nombre: Patricia Liebert

Firma: (ilegible)

ANEXO DE PATENTES DE ABBOTT A

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 25 de septiembre de 2012, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

ASSIGNMENT

This Patent Assignment ("**Assignment**") is made and entered into as of 1 August 2012 by and between Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of Illinois, having a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064 USA ("**Abbott**") and AbbVie Inc., a corporation organized and existing under the laws of Delaware, having a place of business at 1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064 USA ("**AbbVie**").

WHEREAS, Abbott has agreed to assign and transfer to AbbVie and AbbVie has agreed to acquire and accept from Abbott the patent applications and patents set forth on Abbott Patent Schedule A (the "**Abbott Patents**") attached hereto.

NOW, THEREFORE, in consideration of the premises, mutual covenants and provisions herein contained, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, and intending to be legally bound hereby, the parties hereto agree to execute this Assignment, as follows:

1.0 Assignment. Abbott has assigned and/or by these presents does hereby assign, transfer and convey unto AbbVie, Abbott's whole and entire right, title and interest (i) in and to the inventions claimed in the Abbott Patents, including all patents granting from said applications on said Abbott Patents or any continuation, continuation-in-part, division, renewal, substitute, reexamination or reissue thereof, including any patents obtained based upon a claim of priority to any patent or patent application on said Abbott Patents and (ii) in and to all rights to sue for and collect damages resulting from past, present and future infringement of said patents and patent applications in (i).

2.0 Enjoyment. The patents and patent applications subject to Paragraph 1 shall be held and enjoyed by AbbVie, for AbbVie's use and benefit, and for AbbVie's legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which same may be granted, as fully and entirely as the same would have been held by Abbott had this assignment and transfer not been made.

3.0 Assistance. The parties to this Assignment shall use commercially reasonable efforts to take, or cause to be taken, all actions, and to do, or cause to be done, all things, necessary or advisable to consummate the transactions contemplated by this Assignment. Without limiting the foregoing, each of Abbott and AbbVie shall cooperate with the other without any further consideration to execute and deliver, or use commercially reasonable efforts to cause to be executed and delivered, all documents as may reasonably be necessary to secure the vesting in AbbVie of all rights assigned to AbbVie by this Assignment, including without limitation any documents required to record this Assignment with local patent offices.

(Signature page follows)

IN WITNESS WHEREOF, each of the parties hereto has executed this Patent Assignment, or has caused this Patent Assignment to be executed on its behalf by a representative duly authorized, all as of the date first above set forth.

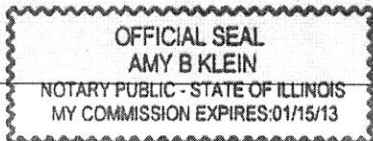
Abbott Laboratories

By: Thomas C. Freyman
Name: Thomas Freyman
Title: Executive Vice President, Finance and
Chief Financial Officer

State of Illinois
County of Lake

Signed and attested before me on August 1, 2012 by Amy B. Klein

Signature: Amy B. Klein

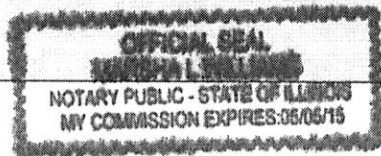


AbbVie Inc.
By: William Chase
Name: William Chase
Title: Authorized Officer of AbbVie Inc.

State of Illinois
County of Lake

Signed and attested before me on July 27, 2012 by William Chase

Signature: Marsha R. Williams



Witness

Name: DINA SHNIDERMAN

Signature: [Signature]

Name: PATRICIA LIEBERT

Signature: Patricia Liebert

IN WITNESS WHEREOF, each of the parties hereto has executed this Patent Assignment, or has caused this Patent Assignment to be executed on its behalf by a representative duly authorized, all as of the date first above set forth.

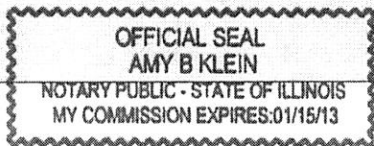
Abbott Laboratories

By: Thomas C. Freyman
Name: Thomas Freyman
Title: Executive Vice President, Finance and Chief Financial Officer

State of Illinois
County of Lake

Signed and attested before me on August 1, 2012 by Amy B. Klein

Signature: Amy B. Klein



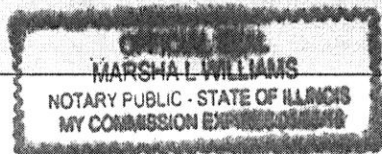
AbbVie Inc.

By: William Chase
Name: William Chase
Title: Authorized Officer of AbbVie Inc.

State of Illinois
County of Lake

Signed and attested before me on July 27, 2012 by WILLIAM CHASE

Signature: Marsha L. Williams



Witness

Name: DINA SHNDERMAN

Name: PATRICIA LIEBERT

Signature: [Signature]

Signature: Patricia Liebert

Abbott Patent Schedule A

Case Ref Number	App. No.	App. Date	Pub. No.	Pub. Date	Patent No.	Grant Date
10523WOO1	PCT/US2011/039430	6/7/11	WO2011/156361	12/15/11		
ENP-215WOO1	PCT/US2011/039397	6/7/11	2011156337	12/15/11		
10525WOO1	PCT/US2011/039582	6/8/11	WO2011/156461	12/15/11		
10526WOO1	PCT/US2011/039591	6/8/11	WO2011/156464	12/15/11		
10527WOO1	PCT/US2011/039603	6/8/11	WO2011/156473	12/15/11		
10531WOO1	PCT/US2011/039769	6/9/11	WO2011/156578	12/15/11		
9346WOO1	PCT/US2011/039958	6/10/11	WO2011/156698	12/15/11		
10536WOO1	PCT/US2011/040501	6/15/11	WO2011/159785	12/22/11		
10325WOO1	PCT/US2011/040669	6/16/11				
10457WOO1	PCT/US2011/041633	6/23/11	WO2011/163478	12/29/11		
10563WOO1	PCT/US2011/043297	7/8/11	WO2012/006490	1/12/12		
10471WOO1	PCT/US2011/044282	7/15/11	2012009698	1/19/12		
10471WOO2	PCT/US2011/044283	7/15/11	2012009699	1/19/12		
11111WOO1	PCT/CN2011/001169	7/15/11				
10590WOO1	PCT/US2011/046233	8/2/11	WO2012/018790	2/9/12		
10594WOO1	PCT/EP2011/063978	8/12/11	2012020134	2/16/12		
10595WOO1	PCT/EP2011/063971	8/12/11	WO2012020130	2/16/12		
10596WOO1	PCT/EP2011/063973	8/12/11	2012/020131	2/16/12		
10227WOO2	PCT/US2011/049147	8/25/11	WO2012/027570	3/1/12		
10470WOO1	PCT/US2011/051356	9/13/11	WO2012/037095	3/22/12		
10674WOO1	PCT/US2011/051603	9/14/11	2012037258	3/22/12		
10672WOO1	PCT/US2011/051875	9/16/11	WO2012/037430	3/22/12		
10673WOO1	PCT/US2011/051874	9/16/11	WO2012/040041	3/29/12		
10473WOO1	PCT/US2011/052668	9/21/11	2012040404	3/29/12		
10723WOO1	PCT/US2011/054959	10/5/11				
10797WOO1	PCT/US2011/055140	10/6/11	WO2012/048134	4/12/20		
10695WOO1	PCT/US2011/055366	10/7/11	WO2012/048222	4/12/12		
10516WOO1	PCT/US2011/055691	10/11/11	WO2012/051147	4/19/12		
10046WOO2	PCT/US2011/056045	10/12/11	WO2012/051361	4/19/12		
10576WOO2	PCT/CN2011/001761	10/24/11				
10722WOO1	PCT/US2011/58024	10/27/11	2012058392	5/3/12		
10724WOO1	PCT/EP2011/069007	10/28/11	2012059431	5/10/12		
10725WOO1	PCT/EP2011/069009	10/28/11	2012059432	5/10/12		
10117WOO1	PCT/US2011/058769	11/1/11	WO2012/061374	5/10/12		
10775WOO1	PCT/US2011/058953	11/2/11	WO2012/067824	5/24/12		
10776WOO1	PCT/US2011/058939	11/2/11	WO2012/067822	5/24/12		
10751WOO1	PCT/US2011/059074	11/3/11	WO2012/061558	5/10/12		
10756WOO1	PCT/US2011/059263	11/4/11				
10484WOO2	PCT/US2011/60038	11/9/11				
10769WOO1	PCT/US2011/060459	11/11/11	2012065122	5/18/12		
10770WOO1	PCT/US2011/060411	11/11/11	WO2012/067963	5/24/12		
10771WOO1	PCT/US2011/060425	11/11/11	WO2012/067965	5/24/12		
10771WOO2	PCT/CN2011/082108	11/11/11				
10757WOO1	PCT/US2011/061678	11/21/11	2012071336	5/31/12		
10728WOO1	PCT/US2011/61769	11/22/11	2012071374	5/31/12		
10707WOO1	PCT/EP2011/072164	12/8/11	2012/076639	6/14/12		
10795WOO1	PCT/US2011/063955	12/8/11	WO2012/078878	6/14/12		
10589WOO1	PCT/US2011/065501	12/12/11	WO2012/083170	6/21/12		
10263WOO2	PCT/US2011/065206	12/15/11	WO2012/083043	6/21/12		
10263WOO3	PCT/US2011/065215	12/15/11	WO2012/083048	6/21/12		
10263WOO4	PCT/US2011/065224	12/15/11	WO2012/083053	6/21/12		
10263WOO5	PCT/US2011/065239	12/15/11	WO2012/083058	6/21/12		
10263WOO6	PCT/US2011/065242	12/15/11	WO2012/083059	6/21/12		
10263WOO7	PCT/US2011/065247	12/15/11	WO2012/083061	6/21/12		
10472WOO1	PCT/US2011/065558	12/16/11	WO2012/087833	6/28/12		
9888WOO3	PCT/US2011/065486	12/16/11	WO2012/083164	6/21/12		
10772WOO1	PCT/US2011/066003	12/20/11				
10546WOO1	PCT/US2011/066530	12/21/11	WO2012/088290	6/28/12		
10547WOO1	PCT/US2011/066557	12/21/11	WO2012/088302	6/28/12		
10690WOO1	PCT/US2011/067699	12/29/11				
10691WOO1	PCT/US2011/067701	12/29/11				
11389WOO1	PCT/CN2011/002224	12/30/11				

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-06-13 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/420,999 08-12-10 US	(51) Int Cl: C12P 21/06 (71) Solicitante(s): ABBVIE, INC. (72) Inventor(es): HSIEH, Cheng-ming; GOODREAU, Carrie; GHAYUR, Tariq; MOELLER, Achim y BOSE, Sahana. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-07-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-12-11 No. de solicitud: PCT/US2011/063955	(87) Publicación internacional Fecha: 14-06-12 No. publicación: WO 2012/078878 A2
(54) Título: “PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-α”	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Proteínas de unión al TNF-α que incluyen anticuerpos quiméricos, con CDR injertadas y humanizados que se unen al TNF-α. Las proteínas de unión presentan una afinidad elevada por el TNF-α y neutralizan la actividad del TNF-α. Una proteína de unión puede ser un anticuerpo completo o una porción de un anticuerpo que puede unirse al TNF-α. Métodos para elaborar y usar las proteínas de unión. Las proteínas de unión al TNF-α son útiles para detectar el TNF-α y para inhibir la actividad del TNF-α, lo que puede realizarse, por ejemplo, en un sujeto humano que padece una enfermedad o un trastorno donde la actividad del TNF-α es perjudicial.

Sector: Biotecnología. Proteínas de Unión a TNF-α útiles en el Tratamiento de enfermedades inmunológicas agudas y crónicas.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 10795W001	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416																
International application No. PCT/US11/63955	International filing date (<i>day/month/year</i>) 08 December 2011 (08.12.2011)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 08 December 2010 (08.12.2010)																	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC: C12P 21/06(2006.01) USPC: 514/2																			
Applicant ABBOTT LABORATORIES																			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (<i>sent to the applicant and to the International Bureau</i>) a total of ____ sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(c), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No.I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (<i>sent to the International Bureau only</i>) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) ____ containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).																			
4. This report contains indications relating to the following items: <table border="0"> <tr> <td>☒ Box No. I</td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>				☒ Box No. I	Basis of the report	☐ Box No. II	Priority	☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐ Box No. VI	Certain documents cited	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the report																		
☐ Box No. II	Priority																		
☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																		
☐ Box No. IV	Lack of unity of invention																		
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																		
☐ Box No. VI	Certain documents cited																		
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application																		
☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application																		
Date of submission of the demand 09 October 2012 (09.10.2012)		Date of completion of this report 25 October 2012 (25.10.2012)																	
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer ZACHARY SKELDING Telephone No. 571-272-4300																	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US11/63955

Box No. I Basis of the report1. With regard to the **language**, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into English which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a)).
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).

2. With regard to the **elements** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

- ☒ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
 pages 1-75 as originally filed/furnished
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
 pages 76-84 as originally filed/furnished
 pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____
- ☐ the drawings:
 pages NONE as originally filed/furnished
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____

☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established:

- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
- ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis) and 70.2(e)).

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US11/63955

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☒ the entire international application.

☐ claims Nos. _____

because:

☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-53

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ See Supplemental Box for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US11/63955**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims _____	YES
	Claims _____	NO
Inventive Step (IS)	Claims _____	YES
	Claims _____	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims _____	YES
	Claims _____	NO

2. Citations and Explanations (Rule 70.7)

Applicant failed to submit a valid electronic sequence listing / CRF in response to the ISA/225 of 27 January 2012. The sequence listing submitted on 28 February 2012 was not in electronic format and could not be entered into the ISA's search system. Accordingly, ISA/US was unable to search the claimed invention (see ISA/203 mailed 4-25-12). Chapter II examination is based on the Chapter I search and no claims were searched in Chapter I. Thus, no opinion can be established with regard to novelty, inventive step or industrial applicability.

449654.TXT
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HSIEH, CHUNG-MING
MOLLER, ACHIM
GOODREAU, CARRIE
GHAYUR, TARIQ
BOSE, SAHANA

<120> PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-ALFA

<130> 10795US01

<140>

<141>

<150> 61/420.999

<151> 2010-12-08

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Asp Arg
20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140

449654.TXT

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 Página 3

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

449654.TXT

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 6
 Phe Gly Xaa Gly
 1

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

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(9)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 7
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido consenso sintético

<400> 8
 Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 9
 Trp Gly Xaa Gly
 1

<210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
			20			

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10						15

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5				10						15	

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
			20			

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys
1				5				10						15

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 31

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

Thr Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 32

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 Página 11

Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 33
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

449654.TXT

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 36

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 37

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 37

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 Página 14

65

70

80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 38

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

449654.TXT

<400> 39

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 40

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

449654.TXT

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 41

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 42

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

```
<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 43
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

449654.TXT

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 45

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

449654.TXT

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

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

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

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

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 46

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: DIANA M. STEEL
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER MA 01605

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

25 APR 2012

Applicant's or agent's file reference
10795WOO1

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US11/63955

International filing date (day/month/year)

08 December 2011

Priority date (day/month/year)

08 December 2010

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

IPC(8) - C12P 21/06 (2009.01)

USPC - 514/2

Applicant

ABBOTT LABORATORIES

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☐ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

19 April 2012

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US11/63955

Box No. 1 Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

The Applicant failed to submit a valid electronic sequence listing/CRF in response to the ISA/225 of 27 January 2012. The sequence listing submitted on 28 February 2012 was not in electronic format and could not be entered into the ISA's search system. Accordingly, ISA/US is unable to search the present claims.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US11/63955

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☒ the entire international application.

☐ claims Nos. _____

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-53

☒ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing: the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☒ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **ANA MARIA CASTRO WEY** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2012-10-11-679
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Estado de Illinois
Secretario de Estado
País de Destino: COLOMBIA

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Jillian A. Pare
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

5. en Chicago, Illinois
6. el 5 de octubre de 2012
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. C12SR24081
9. Sello/Estampilla
Sello del Estado de Illinois

10. Firma: (ilegible)
Jesse White
Secretario de Estado
Estado de Illinois

Esta Apostilla certifica exclusivamente la firma y el sello o estampilla que lleva. No certifica el contenido del documento para el cual se expidió.
ESTA APOSTILLA NO ES VALIDA DENTRO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Dado y firmado este

(firma: ilegible)

Thomas C. Freyman

Vicepresidente Ejecutivo, Director Financiero

AbbVie Inc.

Fecha: 9 / 21 / 12

Estado de Illinois

Condado de Lake

Firmado y testificado ante mí el 9 / 27 / 12 por Thomas C. Freyman

Firma (ilegible)

Sello Oficial

Jillian A. Pare

Notario Público - Estado de Illinois

Mi nombramiento expira: 01/25/13

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 11 de octubre de 2012, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



AbbVie Inc., a company organized and existing under the laws of Delaware

AbbVie, Inc., una compañía organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware.

domiciled at

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A

con domicilio en
1 North Waukegan Road, North Chicago,
Illinois 60064, Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

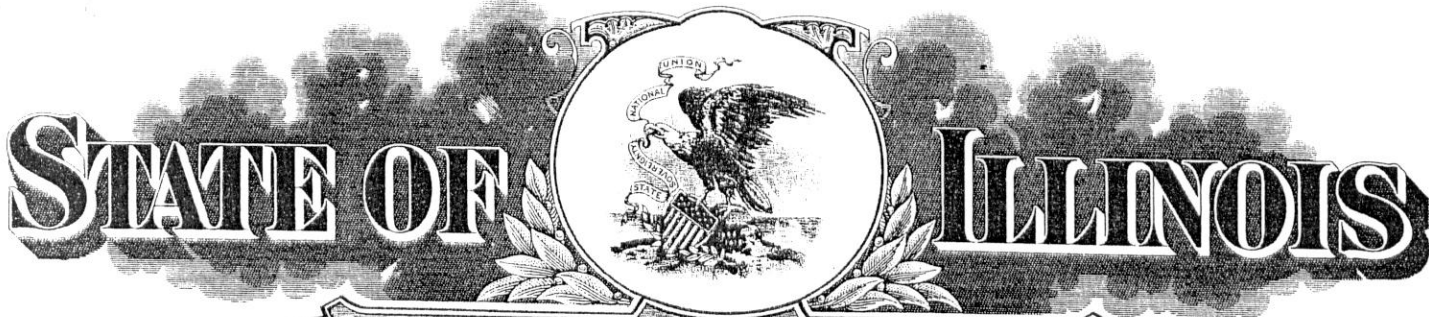
Doctors ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Dado y firmado

The undersigned,



SECRETARY OF STATE

COUNTRY OF DESTINATION: COLOMBIA

APOSTILLE

Convention de La Haye du 5 Octobre 1961

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by JILLIAN A. PARE
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Chicago, Illinois
6. OCTOBER 5, 2012
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. C12SR24081
9. Seal/Stamp:
10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



This Apostille only certifies the signature and the seal or stamp it bears. It does not certify content of the document for which it was issued.

THIS APOSTILLE IS NOT VALID WITHIN THE UNITED STATES OF AMERICA.

♻️ Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. April 2012 — 110M — I 168.3

Given and signed this

Thomas C. Freyman

Thomas C. Freyman

Executive Vice President, Finance and Chief Financial Officer

AbbVie Inc.

Date: 9/27/12

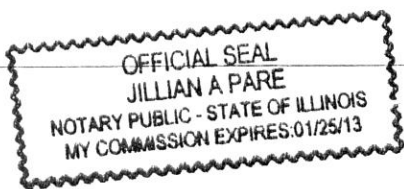
State of Illinois

County of Lake

Signed and attested before me on 9/27/12 by Thomas C. Freyman

Signature

Jillian A. Pare





(51) International Patent Classification:
C12P 21/06 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/063955

(22) International Filing Date:
8 December 2011 (08.12.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/420,999 8 December 2010 (08.12.2010) US

(71) Applicants (*for all designated States except US*): **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064 (US). **ABBOTT GMBH & CO KG** [DE/DE]; Max-Planck Ring 2, 65205 Wiesbaden (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **HSIEH, Chung-ming** [US/US]; 22 Olde Field Road, Newton, Massachusetts 02459 (US). **GOODREAU, Carrie** [US/US]; 201 Stevens Street, Ludlow, Massachusetts 01056 (US). **GHAYUR, Tariq** [US/US]; 1014 Washington Street, Holiston, Massachusetts 01746 (US). **MOELLER, Achim** [DE/DE]; Im Zaunruecken 10, 67269 Gruenstadt (DE). **BOSE, Sahana** [US/US]; 48 Frobes Avenue, Marlborough, Massachusetts 01752 (US).

(74) Agents: **STEEL, Diana M.** et al.; Abbott Bioresearch Center, 100 Research Drive, Worcester, Massachusetts 01605 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with declaration under Article 17(2)(a); without abstract; title not checked by the International Searching Authority
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



(54) Title: **TNF- α BINDING PROTEINS**

(57) Abstract:

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-06-13			
(51) Clasificación Internacional: C12P 21/06			
(71) Solicitante(s): ABBVIE, INC			
(72) Inventor(es): HSIEH, Cheng-ming; GOODREAU, Carrie; GHAYUR, Tariq; MOELLER, Achim y BOSE, Sahana.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/420,999	(32) Fecha 08-12-10	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-07-13		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-12-11 No. de solicitud: PCT/US2011/063955		Fecha: 14-06-12 No. Publicación: WO 2012/078878 A2	
(54) Título: PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-α			
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- Proteínas de unión al TNF-α que incluyen anticuerpos quiméricos, con CDR injertadas y humanizados que se unen al TNF-α. Las proteínas de unión presentan una afinidad elevada por el TNF-α y neutralizan la actividad del TNF-α. Una proteína de unión puede ser un anticuerpo completo o una porción de un anticuerpo que puede unirse al TNF-α. Métodos para elaborar y usar las proteínas de unión. Las proteínas de unión al TNF-α son útiles para detectar el TNF-α y para inhibir la actividad del TNF-α, lo que puede realizarse, por ejemplo, en un sujeto humano que padece una enfermedad o un trastorno donde la actividad del TNF-α es perjudicial. Sector: Biotecnología. Proteínas de Unión a TNF-α. útiles en el Tratamiento de enfermedades inmunológicas agudas y crónicas.			

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-06-13			
(51) Clasificación Internacional: C12P 21/06			
(71) Solicitante(s): ABBVIE, INC			
(72) Inventor(es): HSIEH, Cheng-ming; GOODREAU, Carrie; GHAYUR, Tariq; MOELLER, Achim y BOSE, Sahana.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/420,999	(32) Fecha 08-12-10	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-07-13		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-12-11 No. de solicitud: PCT/US2011/063955		Fecha: 14-06-12 No. publicación: WO 2012/078878 A2	
(54) Título: PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-α			

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 0078/13 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 24 de Junio de 2013 por el Sr. Gabriel Ricaurte Echeverri, C.C. 25.965 de Bogotá, Traductor Oficial según Resolución No. 3987 de agosto 17 de 1981 expedida por el Ministerio de Justicia.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
SUB-SECRETARIO DE COMERCIO DE PROPIEDAD INTELECTUAL
DIRECTOR DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS

Sello con el siguiente texto:

PTAS- 9 de oct 2012- Rotulado-

Yankwich & Asociados

501814559

FEBRERO 10 DE 2012

DIANA M. STEEL
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605



Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

AVISO DE INSCRIPCIÓN DE DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO SE HA INSCRITO POR LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA COMPLETA SE ENCUENTRA DISPONIBLE EN LA SALA DE BÚSQUEDA DE TRASPASOS EN EL NÚMERO DE MARCO Y CARRETE QUE SE RELACIONAN ABAJO.

FAVOR REVISAR TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE INSCRIPCIÓN REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED LLEGA A ENCONTRAR ALGÚN ERROR O TIENE PREGUNTAS ACERCA DE ESTE AVISO, USTED PUEDE CONTACTAR A LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS EN 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS, PARADA DE CORREO: RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS, A.A. 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 02/09/2012

MARCO/CARRETE: 027676/0325

NÚMERO DE PÁGINAS: 8

MEMORIAL: TRASPASO DEL INTERÉS DE LOS CEDENTES (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).

NÚMERO DE EXPEDIENTE: 10795USO1

CEDENTE:

HSIEH, CHUNG-MING

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/23/2012

CEDENTE:

GOODREAU, CARRIE L

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/24/2012

CEDENTE:

BOSE, SAHANA

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/23/2012

CEDENTE:

GHAYUR, TARIQ

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/23/2012

CESIONARIO:

ABBOTT LABORATORIES

100 ABBOTT PARK ROAD

ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064


Gabriel Ricardo Echeverri
Traductor Oficial
Res. 6687 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

NÚMERO DE SOLICITUD: 13314878

FECHA DE RADICACIÓN:

NÚMERO DE PATENTE:

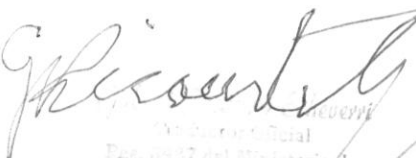
FECHA DE EXPEDICIÓN:

TÍTULO: PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A

027676/0325 PÁGINA 2

RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS

DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS


J. Bissanti
Ene. 1987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

TRASPASO

Yo/Nosotros,

- (1) Chung-ming Hsieh,
- (2) Carrie L. Goodreau,
- (3) Sahana Bose, y
- (4) Tariq Ghayur

Gabriel Ricarte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981



Que residen respectivamente, en

- (1) 22 Olde Field Road, Newton, MA 02459 (EEUU)
- (2) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (EEUU)
- (3) 48 Forbes Avenue, Marlborough, MA 01752 (EE.UU) y
- (4) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (EEUU)

A título oneroso, recibo del cual se reconoce por medio de este documento, han cedido, vendido y transferido y por medio de este documento ceden, venden y transfieren a Abbott Laboratories, una compañía organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois y que tiene una oficina y lugar de negocios en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, sus sucesores y cesionarios:

1) La totalidad del derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países a lo largo del mundo en y para todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos divulgados en la solicitud de los Estados Unidos Ser. N ° 13/314, 878, presentada el 08 de diciembre 2011 (Atty. Expediente No. 10795US01) y la Solicitud Internacional Serial N° PCT/US2011/063955, presentada el 08 de diciembre 2011 (Expediente No. Atty. 10795WOO1) y la designación de AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA,

CF, CG, CH y LI, IC, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HN, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MI, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW, tituladas: "PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A", incluyendo todas las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o re-evaluaciones, prórrogas, continuaciones y divisiones de las mismas, y cualquiera de las solicitudes que las substituyan;

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

2) La totalidad y el derecho completo para presentar las solicitudes de patentes a nombre de Abbott Laboratories, su representante, o a mí nombre a elección de Abbott Laboratories, o su representante, en las invenciones antes indicadas, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo;

3) La totalidad del derecho, título e interés en y sobre cualquier Patente de Invención que se pueda expedir sobre la misma en los Estados Unidos en cualquier otro país del mundo y cualquiera de las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nueva evaluaciones o re-evaluaciones prórrogas, de la misma, y

4) La totalidad del derecho, título e interés en toda Convención y los Derechos de los Tratados de todo tipo, incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y sobre las anteriores invenciones, descubrimientos y solicitudes.

Página 1 de 3

Nosotros por medio de este documento autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes la concesión y expedición de cualquiera y todas aquellas Patentes de Invención en los Estados Unidos y a lo largo del mundo a favor de Abbott Laboratories como cesionario de la totalidad del derecho, título, e interés en la misma, tan plena y completamente como si la misma hubiere sido tenida y

disfrutada por nosotros si no hubiéramos efectuado esta cesión, venta y transferencia.

Nosotros también estamos de acuerdo, en cualquier momento, a solicitud de Abbott Laboratories, para firmar y entregar a Abbott Laboratories todas las solicitudes adicionales para las mencionadas patentes de invención y descubrimientos, o cualquier parte o partes de los mismos, y cualquiera de las solicitudes para la confirmación, registro e importación de las patentes, con base en cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o reevaluaciones y prórrogas de las mismas.

También estamos de acuerdo en cualquier momento para firmar y entregar a solicitud de Abbott Laboratories tales documentos adicionales, si los hubiere, pues son necesarios o convenientes para asegurar la protección de patentes sobre las mencionadas invenciones, descubrimientos y solicitudes a lo largo de todos los países del mundo, y de otra manera hacer lo necesario para darle plenos efectos y para perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories de conformidad con este Traspaso, incluyendo la firma, entrega y la adquisición de cualquiera y todos los demás documentos adicionales que prueben este traspaso, transferencia y venta como puede ser necesario o conveniente.

CEDENTES:

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1961



(1). (Firmado) _____

Chung-ming HSIEH

RECONOCIMIENTO:

En este día 23 de enero de 2012, Chung-ming HSIEH compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

(Firmado)

Firma del Testigo

(Firmado)

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

(2). (Firmado) _____

Carrie L. GOODREAU

RECONOCIMIENTO:

En este día de de 2012, Carrie L. GOODREAU compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

Firma del Testigo

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

Página 2 de 3

(3). (Firmado) _____

Sahana BOSE


Gabriel Ricuarte Echeverri
Traductor Oficial
Des. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

RECONOCIMIENTO:

En este día 23 de enero de 2012, Sahana BOSE compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

(Firmado) _____
Firma del Testigo

_____.(Firmado)
Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

(4). (Firmado) _____
Tariq GHAYUR

RECONOCIMIENTO:

En este día 23 de enero de 2012, Tariq GHAYUR compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

(Firmado) _____
Firma del Testigo

_____.(Firmado)
Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

GR

TRASPASO

Yo/Nosotros,

- (1) Chung-ming Hsieh,
- (2) Carrie L. Goodreau,
- (3) Sahana Bose, y
- (4) Tariq Ghayur

Que residen respectivamente, en

- (1) Olde Field Road, Newton, MA 02459 (EEUU)
- (2) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (EEUU)
- (3) 48 Forbes Avenue, Marlborough, MA 01752 (EE.UU) y
- (4) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (EEUU)


Gabriel Ricarte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

A título oneroso, recibo del cual se reconoce por medio de este documento, han cedido, vendido y transferido y por medio de este documento ceden, venden y transfieren a Abbott Laboratories, una compañía organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois y que tiene una oficina y lugar de negocios en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, sus sucesores y cesionarios:

1) La totalidad del derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países a lo largo del mundo en y para todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos divulgados en la solicitud de los Estados Unidos Ser. N ° 13/314, 878, presentada el 08 de diciembre 2011 (Atty. Expediente No. 10795US01) y la Solicitud Internacional Serial N° PCT/US2011/063955, presentada el 08 de diciembre 2011 (Expediente No. Atty. 10795WOO1) y la designación de AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA,

CF, CG, CH y LI, IC, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HN, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MI, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW, tituladas: "PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A", incluyendo todas las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o re-evaluaciones, prórrogas, continuaciones y divisiones de las mismas, y cualquiera de las solicitudes que las substituyan;

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

2) La totalidad y el derecho completo para presentar las solicitudes de patentes a nombre de Abbott Laboratories, su representante, o a mí nombre a elección de Abbott Laboratories, o su representante, en las invenciones antes indicadas, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo;

3) La totalidad del derecho, título e interés en y sobre cualquier Patente de Invención que se pueda expedir sobre la misma en los Estados Unidos en cualquier otro país del mundo y cualquiera de las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nueva evaluaciones o re-evaluaciones prórrogas, de la misma, y

4) La totalidad del derecho, título e interés en toda Convención y los Derechos de los Tratados de todo tipo, incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y sobre las anteriores invenciones, descubrimientos y solicitudes.

Página 1 de 3

Nosotros por medio de este documento autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes la concesión y expedición de cualquiera y todas aquellas Patentes de Invención en los Estados Unidos y a lo largo del mundo a favor de Abbott Laboratories como cesionario de la totalidad del derecho, título, e interés en la misma, tan plena y completamente como si la misma hubiere sido tenida y

disfrutada por nosotros si no hubiéramos efectuado esta cesión, venta y transferencia.

Nosotros también estamos de acuerdo, en cualquier momento, a solicitud de Abbott Laboratories, para firmar y entregar a Abbott Laboratories todas las solicitudes adicionales para las mencionadas patentes de invención y descubrimientos, o cualquier parte o partes de los mismos, y cualquiera de las solicitudes para la confirmación, registro e importación de las patentes, con base en cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o reevaluaciones y prórrogas de las mismas.

También estamos de acuerdo en cualquier momento para firmar y entregar a solicitud de Abbott Laboratories tales documentos adicionales, si los hubiere, pues son necesarios o convenientes para asegurar la protección de patentes sobre las mencionadas invenciones, descubrimientos y solicitudes a lo largo de todos los países del mundo, y de otra manera hacer lo necesario para darle plenos efectos y para perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories de conformidad con este Traspaso, incluyendo la firma, entrega y la adquisición de cualquiera y todos los demás documentos adicionales que prueben este traspaso, transferencia y venta como puede ser necesario o conveniente.

Gabriel Ricardo Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1988



CEDENTES:

(1). _____

Chung-ming HSIEH

RECONOCIMIENTO:

En este día ____ de ____ de 2012, Chung-ming HSIEH compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

Firma del Testigo

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

(2). (Firmado) _____

Carrie L. GOODREAU

RECONOCIMIENTO:

En este día 24 de enero de 2012, Carrie L. GOODREAU compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

(Firmado)
Firma del Testigo

(Firmado)
Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

Página 2 de 3

(3). _____

Sahana BOSE

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981



RECONOCIMIENTO:

En este día ____ de ____ de 2012, Sahana BOSE compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

Firma del Testigo

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

(4). _____

Tariq GHAYUR

RECONOCIMIENTO:

En este día ____ de ____ de 2012, Tariq GHAYUR compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

Firma del Testigo

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

Página 3 de 3

===

Es traducción fiel y completa de un documento escrito en inglés del cual queda copia en esta oficina y a la cual me remito para su confrontación.


Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

ABT-125.048

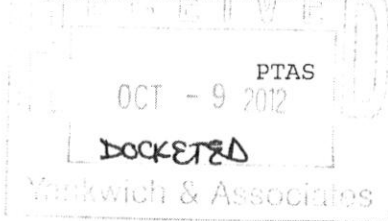


UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

FEBRUARY 10, 2012

DIANA M. STEEL
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605



501814559

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

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

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 02/09/2012

REEL/FRAME: 027676/0325
NUMBER OF PAGES: 8

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 10795US01

ASSIGNOR:
HSIEH, CHUNG-MING

DOC DATE: 01/23/2012

ASSIGNOR:
GOODREAU, CARRIE L

DOC DATE: 01/24/2012

ASSIGNOR:
BOSE, SAHANA

DOC DATE: 01/23/2012

ASSIGNOR:
GHAYUR, TARIQ

DOC DATE: 01/23/2012

ASSIGNEE:
ABBOTT LABORATORIES
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064

APPLICATION NUMBER: 13314878
PATENT NUMBER:
TITLE: TNF-ALPHA BINDING PROTEINS

FILING DATE:
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

I/We,

- (1) Chung-ming Hsieh,
- (2) Carrie L. Goodreau,
- (3) Sahana Bose and
- (4) Tariq Ghayur

residing, respectively, at

- (1) 22 Olde Field Road, Newton, MA 02459 (US),
- (2) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (US),
- (3) 48 Forbes Avenue, Marlborough, MA 01752 (US) and
- (4) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (US)

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois and having an office and a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 13/314,878, filed 08 December 2011 {Atty. Docket No. 10795USO1 } and International Application Ser. No. PCT/US2011/063955, filed 8 December 2011 {Atty. Docket No. 10795WOO1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GT, GW, HR, HN, HK, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MY, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; entitled: "TNF-Alpha BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott Laboratories, its designee, or in my name at the election of Abbott Laboratories or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott Laboratories as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We further agree, at any time, upon the request of Abbott Laboratories, to execute and to deliver to Abbott Laboratories any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

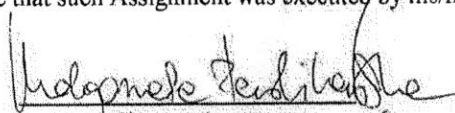
We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott Laboratories under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNORS:

(1) 
Chung-ming HSIEH

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 23rd day of January, 2012, Chung-ming HSIEH personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.


Witness signature
MARGARETA STANISLAW
Witness name (please print)

(2) _____
Carrie L. GOODREAU

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2012, Carrie L. GOODREAU personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Witness signature

Witness name (please print)

(3) Sahana Bose
Sahana BOSE

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 23 day of January, 2012, Sahana BOSE personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Margaret Paulkowsky
Witness signature
MARGARET PAULKOWSKY
Witness name (please print)

(4) Tariq Ghayur
Tariq GHAYUR

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 23 day of January, 2012, Tariq GHAYUR personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Margaret Paulkowsky
Witness signature
MARGARET PAULKOWSKY
Witness name (please print)

ASSIGNMENT

I/We,

- (1) Chung-ming Hsieh,
- (2) Carrie L. Goodreau,
- (3) Sahana Bose and
- (4) Tariq Ghayur

residing, respectively, at

- (1) 22 Olde Field Road, Newton, MA 02459 (US),
- (2) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (US),
- (3) 48 Forbes Avenue, Marlborough, MA 01752 (US) and
- (4) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (US)

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois and having an office and a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 13/314,878, filed 08 December 2011 {Atty. Docket No. 10795USO1 } and International Application Ser. No. PCT/US2011/063955, filed 8 December 2011 {Atty. Docket No. 10795WOO1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GT, GW, HR, HN, HK, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MY, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; entitled: "TNF-Alpha BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott Laboratories, its designee, or in my name at the election of Abbott Laboratories or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott Laboratories as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We further agree, at any time, upon the request of Abbott Laboratories, to execute and to deliver to Abbott Laboratories any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott Laboratories under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNORS:

(1) _____
Chung-ming HSIEH

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2012, Chung-ming HSIEH personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Witness signature

Witness name (please print)

(2) Carrie L. Goodreau
Carrie L. GOODREAU

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 24 day of January, 2012, Carrie L. GOODREAU personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Walgorzata Pauliksen
Witness signature

WALGORZATA Pauliksen
Witness name (please print)

(3) _____
Sahana BOSE

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2012, Sahana BOSE personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Witness signature

Witness name (please print)

(4) _____
Tariq GHAYUR

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2012, Tariq GHAYUR personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Witness signature

Witness name (please print)

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 0079/13 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 24 de Junio de 2013 por el Sr. Gabriel Ricaurte Echeverri, C.C. 25.965 de Bogotá, Traductor Oficial según Resolución No. 3987 de agosto 17 de 1981 expedida por el Ministerio de Justicia.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
SUB-SECRETARIO DE COMERCIO DE PROPIEDAD INTELECTUAL
DIRECTOR DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS

Sello con el siguiente texto:

PTAS- 9 de oct 2012- Rotulado-

Yankwich & Asociados

501814559

FEBRERO 10 DE 2012

DIANA M. STEEL
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605



Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

AVISO DE INSCRIPCIÓN DE DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO SE HA INSCRITO POR LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA COMPLETA SE ENCUENTRA DISPONIBLE EN LA SALA DE BÚSQUEDA DE TRASPASOS EN EL NÚMERO DE MARCO Y CARRETE QUE SE RELACIONAN ABAJO.

FAVOR REVISAR TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE INSCRIPCIÓN REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED LLEGA A ENCONTRAR ALGÚN ERROR O TIENE PREGUNTAS ACERCA DE ESTE AVISO, USTED PUEDE CONTACTAR A LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS EN 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS, PARADA DE CORREO: RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS, A.A. 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 02/09/2012

MARCO/CARRETE: 027677/0843

NÚMERO DE PÁGINAS: 3

MEMORIAL: TRASPASO DEL INTERÉS DE LOS CEDENTES (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).

NÚMERO DE EXPEDIENTE: 10795USO1

CEDENTE:

MOELLER, ACHIM

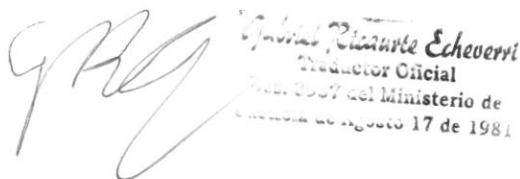
FECHA DEL DOCUMENTO: 01/23/2012

CESIONARIO:

ABBOTT GMBH & CO. KG

MAX-PLANCK-RING 2

WIESBADEN, ALEMANIA 65205



Gabriel Echeverri
Ejecutor Oficial
Pres. 0007 del Ministerio de
Economía y Finanzas 17 de 1981

NÚMERO DE SOLICITUD: 13314878

FECHA DE RADICACIÓN:

NÚMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TÍTULO: PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A

RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS

DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

TRASPASO

Yo/Nosotros,

(1) Achim Moeller

Que tiene una oficina y lugar de negocios en:

(1) Im Zaunruecken 10, 67269 Gruenstadt (DB)

A título oneroso, recibo del cual se reconoce por medio de este documento, han cedido, vendido y transferido y por medio de este documento ceden, venden y transfieren a Abbott GmbH & Co, KG, una compañía organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois y que tiene una oficina y lugar de negocios en Max-Planck-Ring 2 Wiesbaden 65205, sus sucesores y cesionarios:

Guillermo Echeverri
Ejecutor Oficial
del Ministerio de
Agricultura 17 de 1981



1) La totalidad del derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países a lo largo del mundo en y para todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos divulgados en la solicitud de los Estados Unidos Ser. N ° 13/314, 878, presentada el 08 de diciembre 2011 (Atty. Expediente No. 10795US01) y la Solicitud Internacional Serial N° PCT/US2011/063955, presentada el 08 de diciembre 2011 (Expediente No. Atty. 10795WOO1) y la designación de AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH y LI, IC, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HN, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MI, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW, tituladas: "PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TNF-A", incluyendo todas las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o re-evaluaciones,

prórrogas, continuaciones y divisiones de las mismas, y cualquiera de las solicitudes que las substituyan;

2) La totalidad y el derecho completo para presentar las solicitudes de patentes a nombre de Abbott GmbH & Co, KG, su representante, o a mí nombre a elección de Abbott GmbH & Co, KG, o su representante, en las invenciones antes indicadas, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo;

3) La totalidad del derecho, título e interés en y sobre cualquier Patente de Invención que se pueda expedir sobre la misma en los Estados Unidos en cualquier otro país del mundo y cualquiera de las renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nueva evaluaciones o re-evaluaciones prórrogas, de la misma, y

4) La totalidad del derecho, título e interés en toda Convención y los Derechos de los Tratados de todo tipo, incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y sobre las anteriores invenciones, descubrimientos y solicitudes.

Francisco Echeverri
Secretario Oficial
del Ministerio de
Industria
Agosto 17 de 1981

Nosotros por medio de este documento autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes la concesión y expedición de cualquiera y todas aquellas Patentes de Invención en los Estados Unidos y a lo largo del mundo a favor de Abbott GmbH & Co, KG como cesionario de la totalidad del derecho, título, e interés en la misma, tan plena y completamente como si la misma hubiere sido tenida y disfrutada por nosotros si no hubiéramos efectuado esta cesión, venta y transferencia.

Nosotros también estamos de acuerdo, en cualquier momento, a solicitud de Abbott Laboratories, para firmar y entregar a Abbott GmbH & Co, KG todas las solicitudes adicionales para las mencionadas patentes de invención y descubrimientos, o cualquier parte o partes de los mismos, y cualquiera de las solicitudes para la confirmación, registro e importación de las patentes, con base

en cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, restablecimientos, reexpediciones, nuevas evaluaciones o reevaluaciones y prórrogas de las mismas.

Página 1 de 2

También estamos de acuerdo en cualquier momento para firmar y entregar a solicitud de Abbott GmbH & Co, KG tales documentos adicionales, si los hubiere, pues son necesarios o convenientes para asegurar la protección de patentes sobre las mencionadas invenciones, descubrimientos y solicitudes a lo largo de todos los países del mundo, y de otra manera hacer lo necesario para darle plenos efectos y para perfeccionar los derechos de Abbott GmbH & Co, KG de conformidad con este Traspaso, incluyendo la firma, entrega y la adquisición de cualquiera y todos los demás documentos adicionales que prueben este traspaso, transferencia y venta como puede ser necesario o conveniente.

CEDENTE:

(1). (Firmado) _____

Achim MOELLER


Carlos Juanita Echeverri
Traductor Oficial
del Poder Judicial del Ministerio de
Justicia del 17 de Agosto 1981

RECONOCIMIENTO:

En este día 23 de enero de 2012, Achim MOELLER compareció personalmente ante mí, firmó el anterior Traspaso, y debidamente reconocido por mí que tal Traspaso se firmó como un acto de su propia voluntad y libre para los fines y propósitos allí expresados.

_____(Firmado)_____
Firma del Testigo

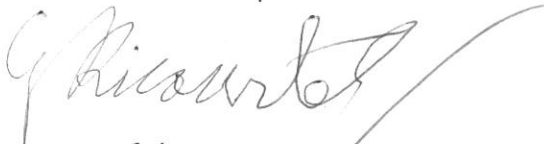
_____.Nadine Paersch_____

Nombre del Testigo (por favor en letra de imprenta)

Página 2 de 2

===

Es traducción fiel y completa de un documento escrito en inglés del cual queda copia en esta oficina y a la cual me remito para su confrontación.



Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

ABT-125.008

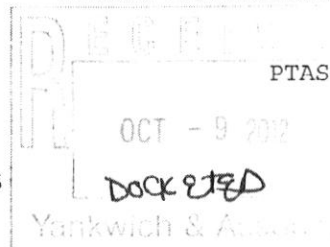


UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

FEBRUARY 10, 2012

DIANA M STEEL
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605



501814898

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

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

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 02/09/2012

REEL/FRAME: 027677/0843
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 10795US01

ASSIGNOR:
MOELLER, ACHIM

DOC DATE: 01/23/2012

ASSIGNEE:
ABBOTT GMBH & CO. KG
MAX-PLANCK-RING 2
WIESBADEN, GERMANY 65205

APPLICATION NUMBER: 13314878
PATENT NUMBER:
TITLE: TNF-ALPHA BINDING PROTEINS

FILING DATE:
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

I/We,

(1) Achim Moeller

having an office and place of business at:

(1) Im Zauruecken 10, 67269 Gruenstadt (DE)

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott GmbH & Co. KG, a corporation organized and existing under the laws of Germany and having an office and a place of business at Max-Planck-Ring 2, Wiesbaden 65205, Germany, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 13/314,878, filed 08 December 2011 {Atty. Docket No. 10795US01} and International Application Ser. No. PCT/US2011/063955, filed 8 December 2011 {Atty. Docket No. 10795WOO1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GT, GW, HR, HN, HK, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MY, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PH, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; entitled: "TNF-Alpha BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott GmbH & Co. KG, its designee, or in my name at the election of Abbott GmbH & Co. KG or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott GmbH & Co. KG as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We further agree, at any time, upon the request of Abbott GmbH & Co. KG, to execute and to deliver to Abbott GmbH & Co. KG any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott GmbH & Co. KG such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott GmbH & Co. KG under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNOR:

(1) Achim Moeller
Achim MOELLER

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 23rd day of January, 2012, Achim MOELLER personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

N. Paersch
Witness signature

Nadine Paersch
Witness name (please print)